

THESIS

MUNICH

1967

Aus dem Klinisch-chemischen Institut
an der Chirurgischen Klinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. Werle

**Über das reninähnliche Enzym
aus der Glandula submaxillaris der weißen Maus**

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF. 94304

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer hohen medizinischen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
KLAUS BAUMEISTER
aus Arnsberg in Westfalen

München 1967

Aus dem Klinisch-chemischen Institut
an der Chirurgischen Klinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Über das reninähnliche Enzym
aus der Glandula submaxillaris der weißen Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer hohen medizinischen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Klaus Baumeister
aus Arnsberg in Westfalen.

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr.Dr. E. WERLE
Dekan: Professor Dr. M. KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 20.6.67

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.

Die vorliegende Arbeit wurde ausgeführt im Klinisch-chemischen Institut an der Chirurgischen Klinik der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle, dem ich für die Überlassung des Themas, die vielfältigen Anregungen und die großzügige materielle Förderung der Arbeit meinen herzlichen

Dank ausspreche.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	9
Material und Methoden	10
Ergebnisse	23
Substratspezifität von WMS	23
Blutdrucksenkende Wirkung von Speicheldrüsen-Extrakt	23
Substratkonkurrenz zwischen WMS und Renin	24
Inaktivierung von WMS durch DFP	24
Inaktivierung von WMS durch Methylenblau	25
pH-Optimum von WMS	25
WMT-inaktivierende Wirkung von WMS-Lösungen	26
Reinigung von WMS	27
Abgrenzung von WMS gegen Amylase	28
Isolierung von WMT	29
Wirkung von WMT am Blutdruck des Hundes	30
Wirkung von WMT an isolierten Organen	31
Inaktivierung von WMT durch verschiedene Eingriffe	32
Papierelktrophorese von WMT	33
Papierchromatographie von WMT	33
Diskussion	34
Abbildungen	38
Literaturverzeichnis	63

Einleitung

Die blutdrucksteigernde Wirkung von wässrigen Extrakten aus der Submaxillardrüse bestimmter Stämme der weißen Maus wurde erstmals 1957 beobachtet (WERLE, VOGEL u. GÖLDEL, 28). Das wirksame Prinzip - vorläufig WMS* genannt - wurde als hochmolekulare eiweißartige Substanz näher charakterisiert. Die Frage, ob WMS bei der intravenösen Injektion am Hund direkt blutdrucksteigernd wirkt oder wie im Fall des Renin erst über die Freisetzung einer niedermolekularen Substanz aus einer inaktiven hochmolekularen Vorstufe im Plasma wurde aufgeworfen, konnte aber zunächst nicht entschieden werden. Verschiedene Befunde, z.B. die Wirksamkeit von WMS am isolierten Kaninchen-Aorten-Präparat, sprachen für einen direkten Angriff am Blutgefäß. TURRIAN (24) konnte jedoch nachweisen, daß in Inkubationsansätzen von WMS mit Rattenplasma eine thermostabile blutdrucksteigernde Substanz entsteht, die durch Alkali oder durch Behandlung mit Pepsin zerstört wird. Diese Befunde konnten durch WERLE (32) bestätigt werden. Die thermostabile Substanz ist dialysabel. Sie wird im folgenden WM-Tensin genannt (WMT). Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit einigen Eigenschaften des WMS sowie mit Analogien zum Renin-Angiotensin-System und mit dem Problem der Isolierung des WMT.

* Weiße Maus Submaxillaris

Material und Methoden

Bereitung der Submaxillaris-Extrakte

Weiße Mäuse des Inzuchtstammes BLH, der sich in Untersuchungen von WILLE u. VOGEL (29) als besonders WMS-reich erwiesen hatte, wurden durch Äther-Inhalation getötet. Die Submaxillardrüsen wurden sofort entnommen, von größeren Fettresten befreit, mit isotonischer NaCl-Lösung abgespült, mit Filterpapier getrocknet und dann gewogen. Hierauf wurden die Drüsen 2-mal bei -18°C eingefroren und bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut oder für spätere Verwendung bei -18°C aufbewahrt. Mit der 10-fachen Menge Wasser wurden die Drüsen im Starmix homogenisiert (WMS 1:10). Die wässrige Suspension wurde nach 2-4-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur mit 7000 Upm zentrifugiert. Der Niederschlag konnte verworfen werden, da sich aus ihm durch erneute Extraktion mit derselben Menge Wasser nur noch geringe WMS-Aktivität gewinnen ließ. Das Überstehende wurde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Bei dieser Temperatur bleibt die Aktivität monatelang erhalten. Für den Ansatz mit Plasma wurden die Extrakte mit Wasser auf das 5- bis 10-fache Volumen oder noch stärker verdünnt. (WMS 1:50 bzw. 1:100 usw.). Gewebs-extrakte aus Mäusenieren wurden in der gleichen Weise hergestellt.

Ansätze (in Anlehnung an TURRIAN, 24)

20 ml Plasma bzw. Serum wurden mit 0,2 ml WMS 1:100 12-15 20 min. bei 37°C inkubiert, dann durch 0,4 ml 2n HCl und durch 5-minütiges Stehen in siedendem Wasser enteiweißt und 10 min. bei 7000 Upm zentrifugiert. Kontrollen ohne WMS wurden gleichermaßen behandelt. Mäusenierenextrakt wurde meistens in einer Menge von 0,1 ml Extrakt auf 10 ml Plasma verwendet. Die blutdrucksteigernde Wirkung wurde am Hund in Morphin-Per-nocton-Narkose bei maschineller Beatmung getestet. Als Standard diente synthetisches Val⁵-Angiotensinamid II.

Hemmung von WMS durch DFP

2 ml WMS 1:100 wurden 30 min. bei Zimmertemperatur mit 18,4 mg Diisopropylfluorophosphat, das in 0,05 ml Isopropanol gelöst war, stehengelassen. Die DFP-Konzentration betrug dabei $5 \cdot 10^{-2} \text{ m}$.

Hemmung von WMS durch Methylenblau

1 ml WMS 1:100 wurde mit 0,5 ml Phosphatpuffer m/15 pH 7,4 und 0,5 ml 0,02 % Methylenblau 60 min. mit einer Operationslampe (250 W) aus 30 cm Abstand belichtet. Kontrollen blieben unbelichtet. Weiteres WMS wurde belichtet, jedoch ohne Methylenblau. Acetongefälltes WMS und Mäusenierenextrakt wurden in derselben Weise behandelt.

pH-Abhängigkeit der WMS-Aktivität.

Rinderplasma wurde vor der Inkubation mit 2n HCl bzw. 2n NaOH auf pH 4,8 , pH 6,0 , pH 7,0 , pH 8,0 , pH 9,0 und pH 10,0 eingestellt; nach Inkubation und Neutralisierung auf pH 6-7 wurden die Ansätze wie oben (S.6) angegeben verarbeitet. Es war jedoch nicht auszuschließen, daß während der Neutralisation und zu Beginn der Erhitzung im Wasserbad die Reaktion weiterlaufen konnte und hierdurch die Ergebnisse beeinflusst waren. Deshalb wurden bei einer weiteren Versuchsreihe mit pH-Werten von 4-9 die Ansätze durch das 2-fache Volumen absoluten Alkohols gefällt, zentrifugiert (7 min. bei 7000 Upm), das Überstehende neutralisiert, im Vakuum-Rotationsverdampfer bei 45°C zur Trockne eingengt und in je 10 ml Wasser aufgenommen.

Leerversuche: 1.) je 15 ml Rinderplasma pH 7 , pH 8 , pH 9 15 min. bei 37°C , dann Alkoholfällung usw.

2.) 0,2 ml WMS 1:50 + 15 ml Wasser + 2 ml m/15 Phosphatpuffer pH 7 , pH 8 , pH 9; 12 min. bei 37°C inkubiert; Zugabe von 2 Vol. Alkohol (keine Fällung), Einengen usw.

Acetonfällung von WMS

20 ml WMS 1:10 durch Kühlung in einer Kältemischung auf 0°C gebracht; dann langsam Zugabe von 16 ml eisgekühltem Aceton unter ständigem Rühren; Niederschlag abzentrifugiert und verworfen; zum Überstehenden weitere 20 ml Aceton. Der jetzt entstehende sehr feine Niederschlag wurde bei 14 500 Upm in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert und in 10 ml Wasser aufgenommen. Zur Entfernung von Acetonresten vorsichtiges Einengen im Vakuum-Rotationsverdampfer bei 35°C bis auf ca. 1 ml und Wiederauffüllen mit Wasser auf 20 ml Endvolumen.

Ammonsulfatfällung von WMS

10 ml WMS 1:10 scharf (20 000 Upm) unter Kühlung zentrifugiert; vom Überstehenden 6,0 ml abpipettiert; dabei eine an der Oberfläche schwimmende Trübung (Fett ?) abgetrennt. Zu den 6 ml WMS langsam und unter Rühren heißgesättigte und wieder abgekühlte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gegeben. Der sehr feine Niederschlag wurde bei 20 000 Upm. abzentrifugiert und erneut in 6,0 ml Wasser gelöst. Wiederholung der Fällung in der gleichen Weise.

Reinigung von WMS an DEAE-Zellulose

Eine DEAE-Säule von 4 cm Länge und 1,9 cm Durchmesser wurde mit m/100 Phosphatpuffer pH 7 äquilibriert. Nach Aufziehen von 4 ml acetongefälltem WMS wurde zunächst mit 50 ml Puffer gewaschen und dann mit 80 ml Puffer + 0,4 % NaCl eluiert, dann mit 80 ml Puffer + 0,6 % NaCl, dann ebenso mit 0,8 %, 1,0 %, 1,2 %, 1,4 %. Das Eluat wurde in Fraktionen von 8 ml gesammelt und die Extinktion der einzelnen Fraktionen bei 280 m μ im Beckman-Photometer gemessen. Die höchste Extinktion zeigte sich in der Waschlösung. Bei den anschließenden NaCl-Konzentrationen stieg die Extinktion nur geringfügig an. Jeweils die Fraktion mit der höchsten Extinktion wurde getestet. Die WMS-Aktivität war am stärksten bei 0,6 - 0,8 % NaCl, konnte jedoch auch noch bei 0,4 und 1,0 % NaCl nachgewiesen werden.

Amylase-Bestimmung (nach SUMNER u. HOWELL, 23)

Die Bestimmung beruht auf der kolorimetrischen Messung der bei Einwirkung von α -Amylase auf gepufferte, NaCl-haltige Stärkelösung entstehenden Maltose. Messung der Farbintensität bei 546 m μ im Eppendorf-Photometer.

Lösungen: I) 1 g lösliche Stärke (nach Zulkowsky) in 20 - 30 ml Wasser + 30 ml m/15 Phosphatpuffer pH 6,9 + 10 ml m/15 NaCl (39 mg/10 ml) lösen; mit Wasser auf 100 ml auffüllen. II) 1 g 3,5-Dinitrosalizylsäure in 50 ml Wasser + 20 ml 2n NaOH lösen; dazu 30 g Seignettesalz, lösen und auf 100 ml auffüllen; schnell mit Stopfen gegen CO₂-Aufnahme schützen.

2 ml Enzymlösung mit 1 ml Lösung I 15 min. bei Zimmertemperatur stehen lassen; Zugabe von Lösung II; genau 5 min. in siedendem Wasserbad erhitzen; Kühlung in Eiswasser und Auffüllung mit Wasser auf genau 20 ml; mit Gummistopfen verschließen und mehrmals zur gleichmäßigen Durchmischung umschütteln. Messung der Extinktion bei 546 m μ und Vergleich mit Eichkurve.

Herstellung der Eichkurve.

Eine 0,2 % Maltoselösung wurde so verdünnt, daß in je 3 ml Lösung 0,2 - 2,8 mg Maltose enthalten waren. Von jeder Verdünnung wurde eine Doppelbestimmung ausgeführt und die Mittelwerte in die Eichkurve eingetragen. (Abb. 1)

Tab. 1

Maltose (mg)	Extinktion	Maltose (mg)	Extinktion
0,2	a 0,012 b 0,012	1,6	a 0,247 b 0,245
0,4	a 0,043 b 0,044	2,0	a 0,322 b 0,315
0,8	a 0,112 b 0,110	2,4	a 0,383 b 0,385
1,2	a 0,179 b 0,176	2,8	a 0,455 b 0,443

Amylase-Inhibitor (nach MILITZER, IKEDA u. KNEEN, 12)

1 kg Weizenmehl wurde in 3,3 l dest. Wasser suspendiert. Danach Zentrifugieren (10 min. 7000 Upm); Einengen des Überstehenden im Vakuum-Rotationsverdampfer bei 45°C auf 185 ml; Erhitzung 5 min. auf 70°C; nach Kühlung Zugabe von absol. Alkohol. Niederschlag bei 70 % Sättigung (430 ml Alkohol) abzentrifugiert und verworfen; zum Überstehenden (560 ml) 1120 ml Alkohol (90 % Sättigung); Niederschlag 3-mal mit absol. Alkoholgewaschen und im Vakuum-Exsiccator getrocknet. Ausbeute: 7,14 g weißes Pulver (Rohinhibitor).

5 g Rohinhibitor in 26 ml Wasser soweit wie möglich gelöst, zentrifugiert; gummiartiger Niederschlag verworfen. Bei 50 % Alkoholsättigung des Überstehenden (n. Originalvorschrift) keine Fällung; deshalb Fällung durch 70 % Sättigung. Niederschlag abzentrifugiert: fraktionierter Inhibitor 1 (FI 1) 0,724 g.

Zweite Fällung bei 90 % Sättigung (n. Originalvorschrift, 70 %): fraktionierter Inhibitor 2 (FI 2): 1,261 g.

Am wirksamsten erwies sich der fraktionierte Inhibitor 1.

Versuch mit Speichelamylase

Tab. 2 Ansätze (Inkubation u. Messung wie S.9 angegeben)

NaCl 0,9% ml	Speichel 1:100 ml	FI 1 0,1% ml	Stärke 1% ml	Ext.
3,0	---	---	---	0,000
1,0	---	1,0	1,0	0,029
0,5	0,5	1,0	1,0	0,080
1,5	0,5	---	1,0	0,382

Nach Abzug der Eigenextinktionen von Stärke und FI 1 verhalten sich die Extinktionen mit und ohne Inhibitor wie $0,051 : 0,353 = 0,144$, d.h. die Restaktivität beträgt 14,4 %. Dies entspricht einer Hemmung von rund 85 %.

Tab. 3 Hemmung der Amylase-Aktivität von WMS

NaCl 0,9% ml	WMS 1:500 ml	FI 1; 1% ml	Stärke 1% ml	Extinktion
3,0	---	---	---	0,000
1,1	---	0,9	1,0	0,036
0,1	1,0	0,9	1,0	0,088
1,0	1,0	---	1,0	0,435

Nach Abzug der Eigenextinktion von Stärke und FI 1 verhalten sich die Extinktionen mit und ohne Inhibitor wie $0,052 : 0,399 = 0,130$, d.h. 13 % der Aktivität waren noch vorhanden; Hemmung 87 %.

Weitere Reinigungsversuche des fraktionierten Inhibitors wurden nach der Originalvorschrift vorgenommen durch Adsorption bei pH 5,5 an Aluminiumoxyd und Elution bei pH 7,5. Trotz mehrfacher Versuche erwies sich das Endprodukt (adsorbierter Inhibitor) als inaktiv und zudem nur wenig wasserlöslich und konnte daher für Ansätze mit WMS nicht verwendet werden.

Tab. 4 Amylase-Aktivität von gereinigtem WMS

Reinigung durch 2-malige Fällung mit Ammonsulfat (40 % Sättigung)

H ₂ O ml	WMS 1:100 ungereinigt ml	WMS 1:100 gereinigt ml	Amylase 0,1 % ml	Stärke 1 % ml	Extinktion
3,0	---	---	---	---	0,000
2,0	---	---	---	1,0	0,013
2,5	---	---	0,5	---	0,063
1,5	---	---	0,5	1,0	0,218
2,95	0,05	---	---	---	0,007
1,95	0,05	---	---	1,0	0,058
2,8	---	0,2	---	---	0,002
1,8	---	0,2	---	1,0	0,015

Reinigung von WM-Tensin (WMT)

Die Mengenangaben von WMT beziehen sich auf die Wirkung auf den Blutdruck des narkotisierten Hundes, d.h. die WMT-Menge von z.B. 1 μ g AA (Angiotensin-Aktivität) verursacht am Hund die gleiche Blutdrucksteigerung wie 1 μ g des als Standard verwendeten Val⁵-Angiotensin-II-amid.

Adsorption an XE 64.

Auf eine XE 64-Säule (Länge 5 cm, Ø 2 cm, pH 6) wurden 100 μ g AA WMT in 5 ml Wasser gelöst gegeben und nach Waschen mit 40 ml H₂O die Elution mit je 40 ml NaOH 0,5 n , 1 n und 2 n versicht. Das Eluat wurde alkalisch während des Durchlaufs der 1 n NaOH und wurde in Fraktionen von 10 ml gesammelt, die, soweit sie alkalisch reagierten, vor der Testung am Hund neutralisiert wurden. In keiner Fraktion war pressorische Aktivität festzustellen. Versuche mit 100 μ g Angiotensin II auf einer frischen Säule verliefen ebenfalls negativ. Auch durch gesättigte NaHCO₃-Lösung ließ sich WMT bzw. Angiotensin nicht eluieren.

Adsorption an Tierkohle (nach PEART, 15, 16)

Reinigung der Tierkohle: 500 g technische Tierkohle (Aktivkohle ist unbrauchbar) wurden einige Stunden bei Zimmertemperatur in 1,5 - 2 l Eisessig gerührt, dann auf der Nutsche auf einem Kieselgurbett mit Aqua dest. und mit Methanol gewaschen und bei 105°C getrocknet.

In 40 l frisches Rinderserum wurden 280 g gereinigte Tierkohle unter mechanischem Rühren gegeben. Nach 10-min. Rühren wurde die Tierkohle abzentrifugiert und verworfen. Das Plasma wurde auf eine Temperatur von 28 - 35 °C gebracht und unter ständigem Rühren mit 300 ml WMS 1:100 versetzt. Nach einer Inkubation von 12 - 15 min. wurde wiederum Tierkohle (7 g/l Ansatz) zugegeben. Die gesamte Inkubationsdauer betrug 30 min. Danach wurde die Tierkohle abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Kohle wurde auf einer großen Nutsche mit dest. Wasser solange gewaschen, bis das Filtrat wasserklar und farblos war. Die Tierkohle wurde nun in 10 l Aqua dest. suspendiert, mit 300 g Kie-

selgur versetzt und die Suspension durch die Nutsche gegeben, auf der schon eine 2 - 3 cm hohe Kieselgursschicht vorbereitet war. Nach Trocknen der Tierkohle auf dem Kieselgurbett wurde mit 1,5 l abbl. Äthanol gewaschen. Die Tierkohle wurde vorsichtig aus dem Nutschentrichter herausgenommen, wobei das Kieselgurbett intakt blieb, und in 3 l Eisessig suspendiert. Nach 10 min. Rühren wurde die Eisessigsuspension erneut abgeseutet. Die Elution wurde 2-mal mit je 1,5 l Eisessig wiederholt. Es erschien ein klares, gelbgrün gefärbtes Eluat, das im Vakuum-Rotationsverdampfer bei 45°C eingeeengt wurde. Nach teilweisem Eindampfen wurde die Destillation unterbrochen und das eingeeengte Eluat durch hochtouriges Zentrifugieren (20 000 Upm.) von restlichen Kohlepartikeln befreit. Danach weiteres Einengen zur Trockne und Aufnahme in 60 ml Wasser. Nachwaschen 3-mal mit je 30 ml Wasser; der unlösliche Rest im Kolben wurde verworfen. Die trübe wässrige Lösung (pH 4,5) wurde durch möglichst hochtouriges Zentrifugieren noch einmal gereinigt und erschien jetzt mehr gelblich gefärbt. Sie wurde mit NaCl gesättigt, mit 2n HCl auf pH 1 angesäuert und im Scheidetrichter 2-mal mit je gleichem Volumen Butanol extrahiert. Aus dem Butanol wurde 3-mal mit je 1/3 Vol. Wasser (bezogen auf die butanolische Lösung) extrahiert, wobei ein großer Teil der gelben Farbe zurückblieb. Der wässrige Extrakt wurde auf ca. 30 ml eingeeengt-

Je 15 ml wässrige Lösung wurden auf Sephadex G 25 (40 cm lang, Ø 2,4 cm) gereinigt. Die aus der Säule ausfließenden Fraktionen von je 12 ml wurden am Mund getestet und im Beckman-Photometer bei 280 m μ gemessen. Die reinsten Fraktionen (10 - 20 μ AA/ml) wurden vereinigt und auf 1/10 Vol. eingeeengt.

Ausbeute : Grobansatz mit 40 l Rinderserum.

A) Rohpräparat: I (1.Elution)	114 ml
Aktivität 21,5 μ AA/ml	= 2450 μ AA
II (2.u.3. Elution)	79,5 ml
Aktivität 20 μ AA/ml	= 1600 μ AA.

Zur Eiweißbestimmung wurden beide Chargen 1:100 verdünnt und im Beckman-Photometer bei 260 und 280 m gemessen.

	ϵ_{260}	ϵ_{280}
I	0,198	0,167
II	0,256	0,217

Daraus errechnet sich nach der Formel

$$\text{Prot. (mg/ml)} = \epsilon_{280} \times 1,55 - \epsilon_{260} \times 0,755$$

ein Proteingehalt von

I	10,95 mg/ml
II	13,9 mg/ml

B) Nach Butanol-Extraktion und wässriger Extraktion:

I	17,6 ml	145 $\times$ AA/ml = 2525 $\times$ AA
II	16,2 ml	112 $\times$ AA/ml = 1815 $\times$ AA

Es war somit im Verlauf der Reinigung eine leichte Zunahme der Gesamtaktivität festzustellen, möglicherweise infolge Abnahme von interferierender Kallidin-Aktivität.

Proteinbestimmung (Verdünnung 1:30)

	ϵ_{260}	ϵ_{280}
I	1,04	1,02
II	0,992	0,974

Proteingehalt:	I	23,9 mg Prot./ml
	II	22,8 mg Prot./ml

Es ergibt sich nach Umrechnung auf das Volumen des Rohpräparates ohne Berücksichtigung der gesteigerten Aktivität eine etwa 3-fache Reinigung, bezogen auf den Proteingehalt. Dazu ist jedoch zu bemerken, daß auch der größte Teil der gelben Farbe durch die Butanolextraktion abgetrennt wurde.

Bei Berücksichtigung der spezifischen Aktivität

I 165 γ Prot./ γ AA

II 204 γ Prot./ γ AA

ergibt sich für I eine 3,1 -fache

und für II eine 3,4 -fache Reinigung

C) Nach Sephadex:

Eingesetzt wurden 17,4 ml WMT I = 2510 γ AA, verteilt auf zwei Säulen. Nur die reinsten Fraktionen wurden verwertet und gemessen.

a)	31,5 ml	23 γ AA/ml	=	725 γ AA
b)	25 ml	26 γ AA/ml	=	650 γ AA
				1375 γ AA

Ausbeute an gereinigtem WMT: 54,5 %.

Proteinmessung (Verdünnung 1 : 5) :

	ϵ_{260}	ϵ_{280}
a	0,101	0,107
b	0,200	0,178

Proteingehalt:

a) 0,400 mg Prot./ml

b) 0,625 mg Prot./ml

Spez. Aktivität:

a) 17,4 γ Prot./ γ AA Reinigung 9,5-fach

b) 24 γ Prot./ γ AA Reinigung 6,8-fach.

Tab. 5 Gesamtreinigung und -ausbeute

Für das Rinderserum als Ausgangsprodukt wird ein Proteingehalt von 6 g% zugrunde gelegt.

Präparat	Ausbeute γAA	Ausbeute in %	spez. Akti- vität γProt./γAA	Reinigung x-fach
Rohansatz	4050	100	600 000	
1.Kohleeluat	2450	100	510	1100
2.Kohleeluat	1600		700	860
nach Buta- nolextraktion				
1.	2525	105	165	3600
2.	1815		104	3000
nach Sephadex- filtration				
1. a)	725	33	17,4	34500
b)	650		24,0	25000

Nach der Butanolextraktion wurde nur die Charge I (1.Kohle-Eluat) weiter auf Sephadex gereinigt. Bezogen auf die Menge des 1. Eluates ergibt sich eine Ausbeute von 56 %.

Inaktivierung von WMT bei verlängerter Inkubation

360 ml Rinderserum wurden mit 3 ml WMS 1:100 inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben von je 20 ml Inkubationsgemisch entnommen und auf oben (S.6) beschriebene Weise weiterverarbeitet.

Inaktivierung von WMT durch Methylenblau

Proben von je 1,0 ml WMT 7,5 γAA/ml bzw. 1,0 ml Angiotensin 7,5γ/ml wurden mit je 0,8 ml Phosphatpuffer m/15 pH 7,4 und 0,2 ml wässrige Methylenblaulösung 0,02 % versetzt und verschieden lange mit einer Operationslampe (250 W) aus 40 cm belichtet. Kontrollen blieben unbelichtet.

Test an isolierten Organen

Es wurde ein 10 ml-Bad verwendet. Als Badflüssigkeit diente für Kaninchenaorten-Streifen und Meerschweinchen-Ileum Tyrodelösung, für den Rattenuterus Jalon'sche Lösg. Das Bad wurde mit Luft durchperlt. Das Übertragungsverhältnis des Schreibhebels betrug 1 : 7.

Die Organe wurden nach der Entnahme zunächst in der entsprechenden Lösung mindestens 2 Std. bei 2°C aufbewahrt. Bei der Entnahme der Kaninchenaorta ist darauf zu achten, daß die Aorta während der Entnahme gut angefeuchtet bleibt, zweckmäßig durch Eingießen von Tyrodelösung in Thorax und Abdomen, nachdem das Blut mit Zellstoff ausgewischt wurde. Aus der unteren Aorta thoracica wurde eine 4 - 5 cm lange 2mm breite Spirale geschnitten (nach FURCHGOTT, 5).

Der Rattenuterus wurde vor der Testung mit 0,1 - 1,0% synth. Oxytocin sensibilisiert.

Badtemperatur: Aorta 37 °C, Meerschweinchen-Ileum 34 °C, Rattenuterus 31 °C.

Elektrophorese von WMT-Lösungen

Für die horizontale Papierelektrophorese im Elphor-Gerät wurden 0,05 ml einer gereinigten WMT-Lösung (250 µg AA/ml) in mehreren Portionen unter Föhntrocknung aufgetragen und eine Spannung von 110 V angelegt. Als Puffer dienten Phosphatpuffer m/50 pH 6 sowie Ammonformiatpuffer m/75 pH 3,5. Die Dauer der einzelnen Trennungsversuche schwankte zwischen 6 und 13 Std. Nach der Trennung wurden die Streifen getrocknet und längs zerschnitten. Eine Hälfte wurde mit Ninhydrin, 0,2 % in Butanol mit 5 % Kollidin, angefärbt, die andere Hälfte wurde in gleich breite Streifen (3 - 7 mm) zerschnitten, die in je 1,0 ml Wasser eluiert wurden. Zum Vergleich wurden entsprechende Mengen von Angiotensin auf einem anderen Streifen aufgetragen.

In die präparative vertikale Papierelektrophorese (Elphor-Gerät) wurden jeweils 0,8 ml WMT eingesetzt (250 µg AA/ml).

Vorschub 0,9 ml/10 Std. Bei Verwendung eines Phosphatpuffers m/100 pH 6 traten hohe Stromstärken von 20 - 25 mA bei 500 V auf. Besser geeignet war ein Ammonformiatpuffer m/75 pH 3,5, bei dem ein Stromstärke von 9 - 10 mA bei 660 V gemessen wurde.

Papierchromatographie von WMT

Es wurden jeweils 25 γ AA WMT bzw. 25 γ Angiotensin in 0,1 ml Lösung entweder allein oder in Mischung aufgetragen, je 2-mal. Das Chromatogramm wurde in Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1 aufsteigend sowie in Butanol/Ameisensäure/Wasser 6 : 1 : 1 absteigend entwickelt. Eine Hälfte des Chromatogramms wurde mit Ninhydrin, 0,2 % + 5 % Kollidin, gefärbt; die andere Hälfte wurde entsprechend den Flecken zerschnitten. Die einzelnen Flecke wurden in je 2 ml Wasser eluiert.

Ergebnisse

Substratspezifität von WMS

Wie die Wirksamkeit von intravenös verabreichtem WMS am Blutdruck des Hundes nahelegt, muß im Blut des Hundes ein geeignetes Substrat vorhanden sein für die Einwirkung des WMS, was sich auch durch Ansätze in vitro von WMS + Hundeserum erhärten läßt (Abb. 2). Gleichfalls wird aus Rinderserum durch WMS WMT freigesetzt, wobei die Ausbeute etwas geringer zu sein scheint, durchschnittlich 100 μ g/1 Rinderserum. Ähnlich geeignet ist Katzenserum, während man aus Pferdeserum nur sehr geringe pressorische Aktivität erhält. Versuche mit Kninchen- sowie Menschenserum verliefen negativ. Inkubationen aus Submaxillar- und Parotisdrüsen von Mensch, Hund, Schwein, Katze, Pferd, Kaninchen, Ratte und Meerschweinchen mit Rinderserum ergaben keine WMT-Bildung. Auch Ansätze von Hunde-, Kaninchen- und Katzen-Submaxillaris mit dem jeweiligen homologen Serum verliefen negativ. Aus der durch Ammonsulfat-Fällung gewonnenen Globulinfraktion des Hundeserums (Abb. 3) sowie aus der α -Globulinfraktion des Schweineserums ließ sich WMT durch die Einwirkung von WMS entwickeln. Die Menge des in den Inkubationsansätzen entwickelten WMT war begrenzt durch die im Serum vorhandene Menge an Substrat (WM-Tensinogen), ferner durch die Inaktivierung durch serumeigene Peptidasen, jedoch nicht durch die verwendete WMS-Menge von 0,1 ml WMS 1:100 auf 10 ml Serum. Vielmehr lag das Ferment immer in starkem Überschuß vor, denn erst bei einer WMS-Zugabe von 0,1 ml WMS 1 : 500 auf 10 ml Serum ließ die pressorische Aktivität nach.

Blutdrucksenkende Wirkung von Speicheldrüsenextrakten

Wie schon lange bekannt, ist die starke Blutdrucksenkung nach intravenöser Injektion von Speicheldrüsenextrakten, die sich auch als mehr oder weniger starke initiale Senkung bei der Injektion von WMS zeigt (Abb. 10), hauptsächlich auf die Wirkung von Kallikrein zurückzuführen,

das in ungereinigten Speicheldrüsen-Extrakten reichlich vorhanden ist und aus einer Vorstufe in der α_2 -Globulinfraktion des Plasmas, dem Kallidinogen, das Kallidin als eigentlich wirksames blutdrucksenkendes Prinzip freisetzt (WERLE, 32). Kallidin wird durch die Plasmakallidinase sehr schnell inaktiviert, weshalb nach einer 20-minütigen WMS-Einwirkung in vitro bei der Messung am Hund nur noch eine Blutdrucksteigerung (Abb. 2) durch das entstandene WMT oder höchstens eine geringfügige initiale Senkung (Abb. 10) resultiert. Zwischen Kallikrein und WMS besteht keine Substratkonkurrenz, denn nach erschöpfender Kallikreineinwirkung in vitro auf Hundeserum ließ sich 45 min. nach der Zugabe des Kallikreins, d.h. zu einem Zeitpunkt, an dem das zunächst gebildete Kallidin vollständig wieder inaktiviert war, noch WMS durch WMT freisetzen.

Substratkonkurrenz zwischen WMS und Renin

Inkubiert man Hunde- oder Rinderserum mit WMS und zusätzlich mit einem wässrigen, Renin enthaltendem Extrakt aus Mäusenieren, so ist die Blutdruckwirkung nicht stärker als durch WMS oder Mäuse-Renin allein, was dafür spricht, daß beide Fermente dasselbe Substrat angreifen. Diese Hypothese ließ sich auch in vivo erhärten, denn im Serum eines Hundes, das 2 Std. nach Verabreichung einer hohen Dosis WMS (3 ml 1:10) gewonnen wurde, ließ sich weder mit Mäusenierenextrakt noch mit WMS eine blutdrucksteigernde Aktivität entwickeln. Serum, das von einem anderen Hund 2 Std. nach Injektion einer größeren Menge von Mäusenieren-Extrakt gewonnen wurde, verhielt sich ebenso (Abb. 4 u. 5).

Inaktivierung von WMS durch DFP

Durch Diisopropylfluorophosphat, das als sehr wirksamer Hemmkörper der Cholinesterase sowie verschiedener eiweißabbauender Fermente bekannt ist, wird eine vollständige Hemmung von WMS in vitro wie auch eine teilweise Hemmung von Mäuserenin erreicht (Abb. 6). Kontrollinjektionen

von DFP allein hatten in der zur Hemmung angewandten Dosis keine Wirkung auf den Blutdruck.

Inaktivierung von WMS durch Methylenblau

Methylenblau vermag unter Lichteinfluß in Polypeptiden die Ringsysteme zyklischer Aminosäuren, vor allem des Histidins, oxydativ zu öffnen, wobei es, wie am Beispiel der Ribonuklease gezeigt, zu einem Verlust der biologischen Wirkung kommt, jedoch keine Denaturierung und keine Photolyse d.h. Aufspaltung der Peptidkette eintritt (WEIL u. SEIBLES, 26). Auch WMS und Mäuserenin wurden durch Zugabe von Methylenblau bei gleichzeitiger Belichtung teilweise inaktiviert, während unbelichtete Kontrollen unverändert aktiv blieben. Eine vollständige Hemmung war bei einstündiger Belichtung nicht zu erreichen. (Abb. 7).

pH-Optimum von WMS

Bei Ansätzen mit Rinderserum, das vorher durch HCl bzw. durch NaOH auf pH-Werte zwischen 4 und 9 eingestellt war, wurden zwei Wirkungsoptima bei pH 6 und pH 9 beobachtet. Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei Ansätzen, die in der üblichen Weise durch Ansäuern und Erhitzen enteivweißt wurden, als auch bei solchen, bei denen die Enteivweißung durch Äthanol vorgenommen und damit eine schnellere Unterbrechung der Reaktion erreicht wurde. Möglicherweise beruht die Wirkungssteigerung im alkalischen Bereich auf der interferierenden Wirkung des Kallikrein im Sinne der Kallidinbildung, die demnach im Alkalischen nicht einträte. Ein etwaiger blutdrucksteigernder Effekt durch die Behandlung von Rinderserum mit HCl oder NaOH konnte durch entsprechende Leerversuche ohne WMS ausgeschlossen werden, desgleichen eine indirekte Einwirkung von WMS bei der Injektion der Inkubationsgemische am Hund.

WMT-inaktivierende Wirkung von WMS-Lösungen

Nierengewebe ist besonders reich an Angiotensinase, und nephrektomierte Tiere sind daher besonders empfindlich gegenüber der Injektion von Renin (GROSS u. SULSER, 8) oder Angiotensin (GROSS u. LICHTLEN, 7). Auch durch WMS d.h. durch die Speicheldrüsenextrakte wird das zunächst gebildete WMT langsam wieder inaktiviert. Jedoch macht sich erst in Ansätzen, denen WMS in sehr starkem Überschuß zugesetzt wurde (z.B. 0,5 ml WMS 1:50 auf 7,5 ml Rinderserum), dieser Effekt bemerkbar. In einem Versuch wurden gereinigtes WMT sowie synthetisches Angiotensin, die auf gleiche pressorische Wirkung am Hund eingestellt waren, mit WMS bzw. Mäusenieren-Extrakt inkubiert. Die blutdrucksteigernde Wirkung beider Substanzen wurde verringert, wobei sich nach der Inkubation mit WMS bei beiden eine initiale Senkung zeigte, besonders beim WMT. Diese Senkung wurde besonders stark auch nach Inkubation von WMT mit einem Extrakt aus Schweine-Submaxillaris, deren Extrakte, soweit bisher bekannt, keine blutdrucksteigernden Substanzen aus Plasma zu entwickeln vermögen, jedoch ebenso wie WMS und andere Organextrakte in der Lage sind, WMT oder Angiotensin zu inaktivieren. Die Senkung kann nicht auf der Wirkung von Kallikrein beruhen, denn die Ansätze wurden nach der Inkubation 45 min. lang im siedenden Wasserbad erhitzt; Kontrollen von WMS oder Schweine-submaxillaris allein, die gleichfalls 45 min. bei 100°C gehalten wurden, verursachten keine Senkung. In einigen Versuchen senkten jedoch auch die Kontrollansätze d.h. WMS allein nach Erhitzung. Bei den Inaktivierungsansätzen fiel hier jedoch auf, daß die Senkung nur durch die Ansätze WMS + Angiotensin, nicht aber durch die Ansätze WMS + WMT verursacht wurde. Diese Beobachtung konnte noch nicht gedeutet werden. Säuert man WMS 30 min. lang bei pH 2 und 0°C an, so wird seine pressorische Aktivität nicht beeinträchtigt. Die WMT-Inaktivierung scheint nur leicht gemindert zu sein (Abb. 8). Nach

20 min. pH 3 bei 36 °C ist die Blutdruckaktivität von WMS ebenfalls noch vorhanden. (Abb. 9).

Reinigung von WMS

WERLE u. VOGEL (29) unterwarfen WMS einer fraktionierten Fällung mit Ammonsulfat und erreichten bei 40 % Sättigung eine Fällung des WMS; bei 65 % fiel das Kallikrein aus. Dieses Verfahren wurde wiederholt, aber die Ergebnisse ließen sich zunächst nicht reproduzieren, da WMS entweder überhaupt nicht, auch nicht bei 50 oder 60 % Sättigung, oder aber nur zusammen mit Kallikrein ausfiel. Größere Ansätze zur Isolierung von WMT wurden daher nur mit ungereinigtem WMS ausgeführt und die Inkubationsdauer so gewählt, daß das durch die Kallikreinverunreinigung gebildete Kallidin durch die Plasmakallidinase wieder inaktiviert wurde und das WMT übrig blieb.

Durch Acetonfällungen in der Kälte ließen sich Verunreinigungen weitgehend entfernen, so daß das WMS in völlig klarer, farbloser wässriger Lösung vorlag im Gegensatz zu den trüben, weißlich-gelb gefärbten Speicheldrüsenextrakten. Eine Trennung WMS und Kallikrein wurde durch die Acetonfraktionierung nicht erreicht. (Abb. 10). Die Aktivität von WMS bleibt bei der Behandlung mit Aceton nur erhalten, wenn die Fällung bei 0 °C mit eisgekühltem Aceton vorgenommen wird. Beim Verhältnis WMS-Lösung : Aceton = 1 : 0,8 fällt ein stärkerer inaktiver Niederschlag aus, beim Verhältnis 1 : 1,8 die Aktivität, die jedoch noch mit der Kallikrein-Aktivität verbunden ist. Daher wurde wieder auf die Ammonsulfat-Fraktionierung zurückgegriffen, und es gelang, durch 2-malige 40 %ige Sättigung mit heißgesättigter Ammonsulfatlösung das WMS so zu reinigen, daß bei der intravenösen Injektion am Hund eine größere initiale Senkung des Blutdrucks nicht mehr nachweisbar war. (Abb. 10).

WMS wird wie Kallikrein an DEAE-Zellulose adsorbiert. Es wurde daher versucht, durch Elution mit NaCl-Lösungen steigender Konzentration eine Trennung beider Stoffe zu erreichen. WMS wurde bei NaCl-Konzentrationen zwischen 0,4 % und 1 % eluiert und verhielt sich damit ebenso wie Kallikrein, so daß eine Trennung nicht möglich war.

Abgrenzung von WMS gegen Amylase

MAIASZEK u. HUGGINS (25) erhielten durch Einwirkung von kristalliner α -Amylase auf Fraktion IV-4 der durch Alkoholfraktionierung gewonnenen Plasmafraktionen nach COHN ein niedermolekulares Polypeptid, dessen Eigenschaften bei der Testung am Blutdruck von Hund, Katze und Kaninchen sowie an verschiedenen isolierten glattmuskulären Organen denen des natürlichen Angiotensin I (Dekapeptid) aus Schweineplasma glichen. Frische wässrige Extrakte aus Mäusesubmaxillaris haben noch deutliche amylatische Aktivität. In gealterten Submaxillaris-Extrakten sowie in durch fraktionierte Aceton- oder Ammonsulfat-Fällung gereinigten WMS-Präparationen war keine amylatische Aktivität mehr nachzuweisen, während die Blutdruckwirkung weiter vorhanden war.

Bei der photometrischen Bestimmung der Amylase-Aktivität nach SUMNER u. HOWELL (26) ergab z.B. 0,2 ml WMS 1 : 100 d.h. diejenige Menge, die zur Inkubation mit 20 ml Rinderplasma verwendet wird, die Extinktion 0,312, 1 ml Amylase-Lösung 0,1 % die Extinktion 0,439. Es ließ sich jedoch selbst mit dem 20-fachen dieser Amylase-Menge, d.h. 20 mg Amylase/20 ml Plasma keine pressorische Aktivität in vitro erzeugen. Auch Ansätze mit menschlichem Speichel (1,0 ml Speichel/20 ml Hundeserum) blieben wirkungslos, während bei der Testung der Amylase-Aktivität bereits 0,2 ml einer mit isotonischer NaCl-Lösung 1:100 verdünnten Lösung dieses Speichels eine Extinktion von 0,402 ergaben. Ebenso wenig war durch intravenöse Injektion von Menschen- und Hundespeichel in verschiedenen Konzentrationen eine Blutdrucksteigerung zu erzielen. Wurde die Amylase von Mäusesubmaxillaris-Extrakten mit dem spezifischen

Amylase-Inhibitor nach MILITZER, IKEDA u. KNEEN (12) zu 85 % gehemmt, so blieb die Fähigkeit dieser Extrakte, WMT zu entwickeln, voll erhalten.

Isolierung von WMT

Aus 10 ml Rinderserum läßt sich durch Inkubation mit WMS eine pressorische Aktivität entwickeln, die im allgemeinen etwa 1 γ , maximal 1,5 γ synth. Angiotensin II entspricht. Die Schwierigkeit, derart geringe Mengen präparativ zu erfassen, liegt auf der Hand. Eine zweite Schwierigkeit hat ihre Ursache in der geringen Haltbarkeit des WMT, dessen Lösungen wie auch diejenigen des synthet. Angiotensin fortwährend an Aktivität verlieren, sofern sie nicht tiefgefroren aufbewahrt werden. Schon das gelegentliche Auftauen zum Gebrauch der Lösungen macht sich durch Wirkungsverlust bemerkbar.

Da WMT in Äthanol löslich ist, wurde zunächst versucht, das Plasmaeiweiß aus dem Inkubationsgemisch mit dem 3-4-fachen Volumen Äthanol zu fällen. Bei größeren Ansätzen sind erhebliche Alkoholmengen erforderlich, und das Überstehende ist nach der Fällung mit 3 Vol. Alkohol noch sehr stark durch Protein verunreinigt. Es wurde stark eingeengt, 3-mal mit Äther ausgeschüttelt, wobei ein Teil der Farbe im Äther gelöst blieb, und erneut mit Alkohol gefällt. Dabei betrug z.B. die Ausbeute aus 1 l Rinderserum 88 AA.

Eine andere Möglichkeit bot die Adsorption aus dem Inkubationsgemisch an eine geeignete Substanz. Es wurden Versuche mit XE 64 unternommen, die jedoch negativ verliefen, da durch Alkoholfällung vorgereinigtes WMT zwar adsorbiert wurde, sich aber weder mit NaOH in verschiedenen Konzentrationen noch mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung eluieren ließ.

Schließlich wurde nach dem Verfahren von PEART (15, 16) das WMT während der Inkubation an Tierkohle adsorbiert und nach Abzentrifugieren der Tierkohle mit Eisessig eluiert. PEART wandte dieses Verfahren zur Isolierung von Angiotensin an. Nach seinen Ergebnissen ist das An-

giotensin nach der Adsorption an Tierkohle der Einwirkung der Angiotensinase entzogen. Nach mehreren Vorversuchen mit Serummengen von 0,5 - 4 l wurde eine Inkubation von 40 l Rinderserum + 300 ml WMS 1:100 vorgenommen. Die weitere Reinigung erfolgte durch Extraktion mit Butanol aus saurer NaCl-gesättigter Lösung und nachfolgende wässrige Extraktion, bei der vor allem die gelbliche Farbe des WMT-Rohpräparates weitgehend im Butanol zurückblieb. Der Rest der Farbe sowie ein Teil der noch vorhandenen Proteinverunreinigung konnte auf Sephadex G 25 abgetrennt werden, nachdem Vorversuche mit Sephadex G 75 negativ verlaufen waren. Beim Durchlauf durch Sephadex erscheint die Aktivität zuerst, während die Verunreinigungen, gemessen als Extinktion bei 280 m μ im Beckman-Photometer, erst ihr Maximum erreichten, wenn die Aktivität wieder auf 0 abgesunken war. Regelmäßig war nach Absinken des ersten Maximums der Extinktion noch ein Wiederanstieg zu beobachten, der aber nicht mit pressorischer Aktivität vergesellschaftet war. (Abb. 12 u. 13). Es ergab sich in den reinsten der ausfließenden Fraktionen eine spezifische Aktivität von 17,4 - 25 Prot./ μ AA. Auffällig war, daß in mehreren Versuchen synthet. Angiotensin II nach Auftragen auf Sephadex nicht mehr zu eluieren war. Es dürfte sich hier wohl um bakterielle Zersetzung des reinen Präparates während des Durchlaufs handeln.

Wirkung von WMT am Blutdruck des Hundes.

Die Blutdrucksteigerung durch WMT am narkotisierten Hund ist ähnlich der Wirkung von Angiotensin (Abb. 1). Durch hochgereinigtes WMT wurde der Blutdruck manchmal initial etwas gesenkt und dann erst gesteigert (Abb. 24) bzw. der Anstieg der Blutdruckkurve verlief flacher (Abb. 13). Dieser Effekt ist vermutlich auf Verunreinigung durch Kallidin zurückzuführen, da für die Ansätze gereinigtes WMS noch nicht zur Verfügung stand. Da während der Inkubation das entstandene Kallidin schnell, WMT aber nur langsam durch die Plasmapeptidasen inaktiviert wird, wurde die Tierkohle erst 12 - 15 min. nach

Inkubationsbeginn in den Ansatz gegeben, um die Inaktivierung des Kallidins vor der Bindung an Tierkohle zu erreichen. Offenbar wurden dennoch geringe Kallidinreste adsorbiert und verursachten an besonders kallidinempfindlichen Hunden eine geringe initiale Blutdrucksenkung. Das Verhältnis zwischen Blutdrucksteigerung durch WMT und Angiotensin einerseits und Arterenol andererseits betrug im allgemeinen 2:1 (Abb. 14), jedoch kamen individuelle Schwankungen nach oben und unten bei den einzelnen Testhunden vor.

Wirkung von WMT an isolierten Organen.

An der isolierten Kaninchen-Aortenspirale nach FURCH-GOTT (5) verursacht gereinigtes WMT wie Angiotensin eine intensive Kontraktion, die erst nach 10 - 20 min. vollständig abgeklungen war (Abb. 14). Als Testobjekt war jedoch der Aortenstreifen, obwohl auf Kallidin nicht ansprechend, ungeeignet, da die Ansprechbarkeit auf WMT und damit die Stärke der Kontraktionen sich von einer Injektion zu anderen ständig änderte. Ferner machte sich die lange Erschlaffungszeit störend bemerkbar; sie ließ sich auch durch Zugabe von Natriumazid nicht wesentlich verkürzen, das nach Untersuchungen von WERLE u. STÜCKER (30) die Wirkung von Arterenol stark vermindert. Lediglich kurz nach dem Maximum der Kontraktion war durch Natriumazid eine leichte Beschleunigung der Erschlaffung zu erzielen (Abb. 15), bei späteren Zugaben, wenn die Erschlaffung schon weiter fortgeschritten war, nicht mehr. Der Versuch, mit kleineren Testdosen geringere Ausschlagshöhen und damit schnellere Erschlaffung sowie gleichmäßigere Ansprechbarkeit zu erreichen, gelang nicht. Im unteren Dosisbereich machte sich eine deutliche Wirkungsschwelle bemerkbar, weswegen bei kleinen Dosen minimale bzw. überhaupt keine Ausschläge resultierten, die bei geringer Erhöhung der Dosis unverhältnismäßig zunahmen (Abb. 15).

Der Uterus der infantilen Ratte spricht wie auch das Ileum des Meerschweinchens auf WMT an. An beiden Testobjekten zeigte sich gegenüber der Blutdrucksteigerung am Hund eine etwa doppelt so starke Reaktion auf WMT, verglichen mit einem Standard von Synthet. Angiotensin II. (Abb. 16, 17, 18). Am Meerschweinchen-Ileum läßt sich die Wirkung von WMT zu ca. 70 % hemmen, wie von KHAIRALLA u. PAGE (11) für Angiotensin beschrieben wurde. Die Atropinhemmung hielt auch nach Spülen an. War erst einmal die zur Wirkung notwendige Mindestdosis Atropin erreicht, die je nach der Empfindlichkeit des jeweiligen Darmpräparates zwischen 2 μ und 10 μ d.h. 0,2 μ und 1,0 μ /ml Badflüssigkeit lag (Abb. 18, 19), so ließ sich auch durch eine Erhöhung der Dosis auf das 10-fache die Hemmwirkung nicht weiter verstärken. Durch Prostigmin wurde die Atropinwirkung aufgehoben bzw. die Wirksamkeit des WMT noch gesteigert. Die Latenzzeit für die Wirkung am Darm beträgt 3-4 sec.

Inaktivierung von WMT durch verschiedene Eingriffe.

Durch Behandlung mit Natronlauge geht die pressorische Wirkung von WMT verloren, während es gegenüber Salzsäure beständig ist. (Abb. 20). Wie durch Extrakte aus Nierengewebe wird WMT auch durch Plasma bzw. Serum inaktiviert, allerdings wesentlich langsamer. Daher steigt in einem Ansatz mit verlängerter Inkubationsdauer ohne Zugabe von Tierkohle die WMT-Aktivität bis etwa 30 min. nach Beginn der Inkubation an, um dann langsam wieder abzufallen. Nach 60 - 70 min. ist nur noch eine geringe Aktivität nachzuweisen (Abb. 21).

WMT kann ferner durch Methylenblau unter Lichteinfluß inaktiviert werden (Abb. 22). Angiotensin verliert gleichfalls durch diese Behandlung innerhalb von 90 min. vollständig seine Aktivität, was in diesem Fall auf oxydativer Öffnung des Histidinringes beruht, während der Tyrosinring erhalten bleibt (PAIVA u. PAIVA, 14). Bei vergleichenden Ansätzen wurde Angiotensin etwas schneller als WMT inaktiviert.

Papierelektrophorese von WMT

Bei der horizontalen Papierelektrophorese wandert WMT in m/50 Phosphatpuffer pH 6 gleich schnell wie Angiotensin zur Kathode, dabei läuft die blutdrucksenkende Komponente, wahrscheinlich Kallidin, etwas schneller (Abb. 23, 24). Mit Hilfe der präparativen Papierelektrophorese wurde eine weitere Reinigung des hochgereinigten WMT versucht. Da die Leitfähigkeit des Phosphatpuffers sich für diesen Zweck als zu hoch erwies, wurde m/75 bis m/200 Ammonformiatpuffer verwendet. Mit der angewandten Spannung von 600 - 660 V ließ sich jedoch nur eine geringe Ablenkung der WMT-Aktivität bzw. der Proteinverunreinigungen erzielen. Die Versuche müßten mit größeren Spannungen wiederholt werden.

Papierchromatographie von WMT

Das papierchromatographische Verhalten von WMT wurde in verschiedenen Lösungsmittelgemischen geprüft. In Phenol/Wasser 8 : 2 wanderte WMT ebenso wie Angiotensin mit der Front. In Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1 aufsteigend sowie in Butanol/Ameisensäure/Wasser 6 : 1 : 1 absteigend (Abb. 25) wanderten beide Substanzen gleich schnell, wobei die Rf-Werte bei 0,2 bzw. 0,25 lagen. Die Anfärbung mit Ninhydrin ergab, daß WMT noch durch eine Reihe ninhydrinpositiver Substanzen, wahrscheinlich niedermolekularer Peptide und Aminosäuren verunreinigt war. Es traten Flecken in den Farben rot, gelb, blaurot und grau auf. Die WMT-Aktivität bzw. das Angiotensin II lagen an sehr schwach blau-grau angefärbten Stellen. Mit Hilfe der Chromatographie auf dickem Karton müßte sich eher eine präparative Reinigung größerer WMT-Mengen erreichen lassen.

Diskussion

Nach den geschilderten Untersuchungsergebnissen stellt sich ein interessantes Bsp. dar, das wie Renin aus einem Bruch der Molekulfraction ein pharmakologisch aktives Polypeptid abspaltet. Das Bsp. MS kommt, soweit untersucht, nur bei gewissen Mäusestämmen vor. Wie VERLE (12) am Beispiel der Leuten-Maus zeigen konnte, wird die Fähigkeit zur Bildung des Bsp. dominant vererbt. Nach früheren Untersuchungen von VERLE u. VOGEL (13) wird durch eine einmalige Injektion von MS das gesamte im Blut kreisende α -Tensinogen verbraucht; das Versuchstier ist gegen eine zweite Injektion von MS refraktär. Deshalb erfolgt auch der qualitative Nachweis des Bsp. MS besser durch Injektion des von ihm freigesetzten α -Tensin als durch die Injektion des Bsp. selbst. Die Tachypylaxie für MS beruht also auch auf Renin. Da umgekehrt eine Renin-Injektion eine Tachypylaxie für Renin und MS hervorruft, ist somit erwiesen, daß die Wirkung der beiden Vermente auch auf ein und dasselbe Substrat, nämlich auf Angiotensinogen erstreckt.

MS kann nicht mit Renin identisch sein, da die beiden Enzyme verschiedene Spezifität¹² für Renin aus Blutseren angiotensin freisetzt, aus denen MS kein α -Tensin entwickeln kann, und da Renin in vielen Spezies vorkommt, die MS nicht im Blut vorfinden. Bemerkenswert erscheint, daß MS besonders eine Reninkonzentration aufweist, die diejenige der kindermiere schreckungsweise um eine Tausendfache übersteigt, die übersteigt sogar die Reninkonzentration der kindermiere, die nach quantitativen Untersuchungen von SCHWABENBERG, KATO u. KOLDFELD (14) an einer Reihe von Säugertieren den höchsten Gehalt aufwies. Es ist auch verschieden vom Kallikrein der Salamandria, das nicht nur bei der Maus sondern bei vielen anderen Säugertieren vorkommt. Auch wird Kallikrein durch MS oder Renin nicht angegriffen, wie umgekehrt Angiotensinogen oder α -Tensinogen durch Kallikrein nicht abgebaut werden. Die Inaktivierbarkeit von MS, Renin und Kallikrein durch Bestrahlung mit ultravioletten

Licht in Gegenwart von Methylenblau (VERLE u. APPEL, 27) und ihre Inaktivierbarkeit durch DFP deuten darauf hin, daß diese drei Enzyme in ihrem aktiven Zentrum als funktionell wichtige Komponenten Histidin- und Serinmoleküle besitzen müssen. Diese Eigenschaften haben sie mit Trypsin, Chymotrypsin, Phosphoglukomutase und verschiedenen Esterasen gemeinsam. Da nach WALASZEK u. HUGGINS (25) auch bei Inkubation von α -Amylase mit Serum eine hypertensive Substanz entsteht, war WMS gegen α -Amylase abzugrenzen. Es war jedoch äußerst unwahrscheinlich, daß es sich bei dem Enzym WMS um α -Amylase handeln könnte, weil α -Amylase in den Extrakten aus Speicheldrüsen der meisten Tiere und des Menschen in hohen Konzentrationen vorkommt. Diese sind aber unter unseren Versuchsbedingungen nicht befähigt, eine blutdrucksteigernde Substanz aus Serum bzw. Plasma zu entwickeln. Zudem konnten WALASZEK u. HUGGINS (25) ihre pressorische Substanz (Substance A) auch aus erhitztem Plasma gewinnen, was wiederum gegen die Identität mit WM-Tensin spricht.

WM-Tensin gleicht in seinen Wirkungen dem Angiotensin II. Es steigert den Blutdruck, kontrahiert den isolierten Darm des Meerschweinchens und den isolierten Uterus der Ratte, den Aortenstreifen des Kaninchens und die Gefäße des isolierten Schweineohrpräparates (VERLE u. VOGEL, 29). Wie die Wirkung von Angiotensin, so wird auch die Wirkung von WM-Tensin am Meerschweinchen-Ileum durch Atropin zu ca. 70 % gehemmt. Die verbleibende Aktivität ist auch durch einen 10-fachen Atropin-Überschuß nicht unterdrückbar. Wie Angiotensin greift also das WMT teils über die Vermittlung der intramuralen Ganglien teils direkt an der glatten Muskulatur des Darmes an. Die Latenzzeit am Darm ist größer als bei Histamin. Auch chemisch verhalten sich WM-Tensin und Angiotensin II sehr ähnlich: Sie sind empfindlich gegen n NaOH, unempfindlich gegen n HCl. Sie werden durch die verschiedensten Organextrakte etwa gleich schnell inaktiviert, zeigen bei der Horizontalelektrophorese gleichen Wanderungssinn und gleiche Wanderungsgeschwindigkeit und haben den gleichen Rf-Wert.

Durch Blutplasma werden WM-Tensin und Angiotensin nur sehr langsam abgebaut. WM-Tensin wird wie Angiotensin in Gegenwart von Methylblau durch Bestrahlen mit Licht rasch zerstört; demnach enthält WM-Tensin wie Angiotensin ein für seine Aktivität wichtiges Histidinmolekül (PAIVA u. PAIVA, 14).

Obwohl also beide Peptide aus dem gleichen Globulin stammen und obwohl sie pharmakologisch und chemisch weitgehend gleiche Eigenschaften aufweisen, ist ihre Identität noch nicht gesichert.. Insbesondere ist auch noch nicht geklärt, ob WMT in zwei verschiedenen Formen vorkommt, entsprechend dem Angiotensin I und II. Die Wirksamkeit am Rattenuterus würde zwar eher auf eine Identität mit Angiotensin II hindeuten, denn Angiotensin I ist am Rattenuterus praktisch unwirksam (CARLINI, PICARELLI u. PRADO, 2; BUMPUS, KHAIRALLAH, ARAKAWA, PAGE u. SNEY, 1), offenbar infolge Fehlens des converting enzyme, während alle anderen glattenmuskulären Testorgane nicht nur auf Angiotensin II sondern auch auf Angiotensin I reagieren. Da Verunreinigungen mit Kallidin nicht auszuschließen sind, das Kallidin andererseits am Uterus sehr wirksam ist, muß diese Frage sehr vorsichtig beantwortet werden. Daß das bisherige reinste WM-Tensin am isolierten Meerschweinchendarm etwa doppelt so wirksam war wie eine am Blutdruck des Hundes äquipotente Menge, könnte ebenfalls auf einer Verunreinigung mit Kallidin beruhen, das möglicherweise durch die Kallidinase innerhalb der Inkubationszeit nicht quantitativ zerstört wird. Die Frage nach der Identität von WM-Tensin und Angiotensin ist endgültig erst nach der Isolierung von WM-Tensin in Reinsubstanz und seiner Bausteinanalyse zu beantworten.

Zusammenfassung

Die Glandula submaxillaris gewisser Mäusestämme enthält ein reninähnliches Enzym, WMS genannt. Es vermag aus

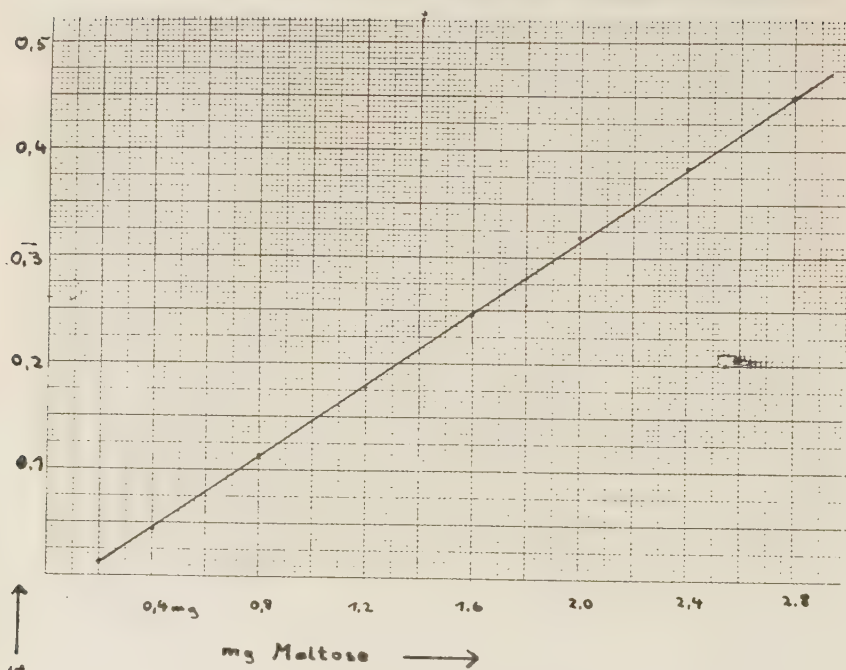
einem Plasmaglobulin (WM-Tensinogen) ein vasopressorisches Polypeptid (WM-Tensin) abzuspalten. Das Enzym wurde näher charakterisiert und gegen Kallikrein und Amylase abgegrenzt. WM-Tensinogen ist identisch mit Angiotensinogen aber verschieden von Kallidinogen. WM-Tensin wurde hoch angereichert; es verhält sich chemisch und pharmakologisch sehr ähnlich dem Angiotensin II.

Anmerkung in Fortführung der Arbeit:

WERLE, TRAUTSCHOLD u. SCHMAL (33) gelang inzwischen die weitere Reinigung des WMT sowie die Trennung in zwei verschiedene Substanzen, die als Angiotensin I (ca. 80 %) und Angiotensin II (ca. 20 %) identifiziert wurden.

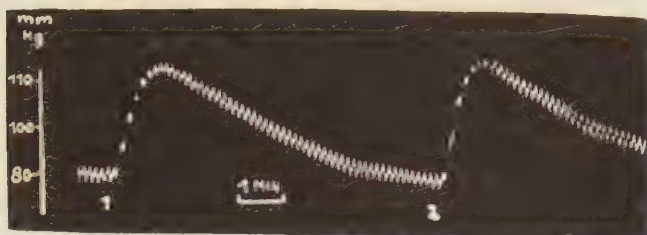
Abbildungen

Abb. 1 Eichkurve für die Amylasebestimmung



Abszisse: Freigesetzte Maltose in mg;
Ordinate: Extinktion bei 546 m μ aufgrund der Farb-
reaktion mit 3,5-Dinitrosalizylsäure..

Abb. 2 Freisetzung von WMT aus Hundeserum



Hund, 7 kg, Morphin-Pernocton-Narkose, künstl. Beatmung.

100 ml Hundeserum 15 min. mit 1 ml WMS 1:100 inkubiert, Enteiweißung wie S.6 angegeben.

i.v.Inj.: 1) 5 ml WMT entsprechend 3,75 ml Hundeserum
2) 2 γ Angiotensin II.

Abb. 3 Nachweis von WM-tensinogen in der Globulinfraktion



Hund, 9 kg, Morphin-Pernocton-Narkose, künstl. Beatmung.

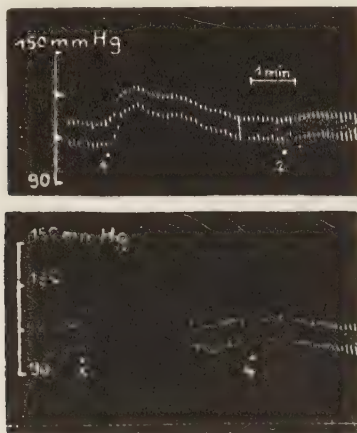
1) WMT, entwickelt aus der Globulinfraktion von 5 ml Hundeserum durch Inkubation mit WMS;

2) WMT aus 5 ml Hundegesamtserum.

Globulinfraktion durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gewonnen. Die initiale Senkung bei 1) ist verursacht durch Kallidin, das aus dem Kallinogen der Globulinfraktion durch das in der WMS-Lösung noch vorhandene Kallikrein freigesetzt wurde. In Ansatz 2) wurde zwar auch Kallidin neben WMT gebildet, aber innerhalb der Inkubationszeit durch die Kallidinase des Gesamtserums inaktiviert.

Abb. 4 Nachweis der Identität von WM-Tensinogen und
Angiotensinogen

Einem 10 kg schweren Hund wurden 3 ml WMS-Extrakt 1:10 i.v. injiziert. Vor der Injektion und 2 Std. nach der Inj. wurde Blut entnommen, daraus Serum gewonnen. Je 20 ml der beiden Serumproben wurden 0,2 ml Mäusenieren-Extrakt 1:20 (1g Niere + 20 ml Wasser) bzw. 0,2 ml WMS 1:100 inkubiert und anschließend enteiweißt. Je 10 ml der resultierenden Lösungen wurden einem zweiten nar-
kotisierten Hund injiziert.



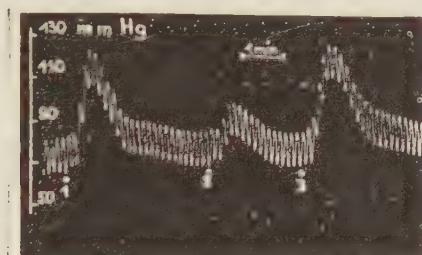
Hund, 12 kg, Morphin-Pernocton-Narkose, künstl. Beatmung.

1) u. 3) normales Hundeserum, mit "Renin" bzw. WMS inkubiert.

2) u. 4) Hundeserum nach i.v. Injektion von WMS gewonnen, mit Renin bzw. WMS inkubiert.

Abb. 5 Nachweis der Identität von WM-Tensinogen und
Angiotensinogen

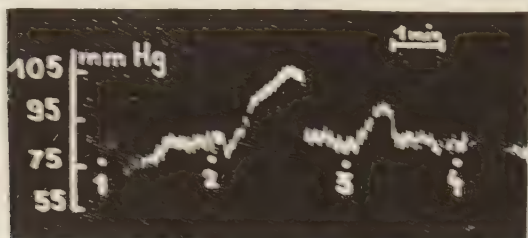
Einem 12 kg schweren Hund wurden 10 ml Mäusenieren-Extrakt 1:10 injiziert. Vor und 2 Std. nach der Inj. wurde Blut entnommen und daraus Serum gewonnen. Je 20 ml der beiden Serumproben wurden mit 0,2 ml WMS-Extrakt 1:100 bzw. 0,2 ml Mäusenieren-Extrakt 1:20 inkubiert, enteiweißt und einem zweiten Hund injiziert.



i.v. Injektionen: 1) u. 3) normales Serum, mit Mäusenieren-Extrakt bzw. WMS inkubiert.
2) Serum nach Vorbehandlung mit Mäusenieren-Extrakt gewonnen und mit WMS inkubiert.

Abb. 6 Inaktivierung von WMS durch DFP

WMS-Lösung wurde mit DFP versetzt (Endkonzentration $5 \cdot 10^{-5} \text{ m}$). Rinderserum wurde mit dieser und mit unbehandelter WMS-Lösung inkubiert (je 0,1 ml WMS 1:200 auf 10 ml Rinderserum), enteiweißt und am Hund i.v. injiziert (je 5 ml).



Hund, 12 kg, Morphin-Pernecton, Carotisdruk.

1) Ansatz mit WMS + DFP; 2) ohne DFP;

3) 0,4% synthet. Angiotensin II; 4) 0,5 mg DFP.

Abb. 7 Inaktivierung von WMS und Renin durch Licht in Gegenwart von Methylenblau

Es wurden WMS- bzw. Reninlösungen, die 0,005 % Methylenblau enthielten, 120 min. lang bestrahlt. Kontrollen blieben unbelichtet. Anschließend wurden die Lösungen mit Rinderserum inkubiert und enteiweißt.

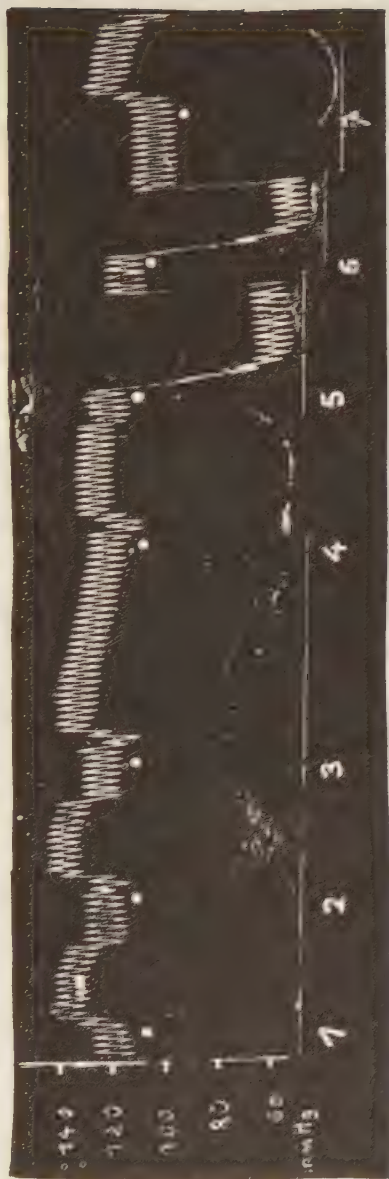


i.v. Injektion. Carotisdruk.

Je 5 ml Rinderserum nach Inkubation 1) mit unbelichtetem WMS, 2) mit belichtetem WMS, 3) mit belichtetem, 4) mit unbelichtetem Mäusenierenextrakt.

Abb. 8 Inaktivierung von WMT und Angiotensin durch Mäusesubmaxillaris-Extrakt.

Verwendet wurde WMS, das 30 min. lang bei 0°C säurebehandelt war (pH 2) sowie unbehandeltes WMS. Jeder Ansatz wurde 20 min. bei 37°C inkubiert und anschließend 45 min. im siedenden Wasserbad erhitzt, ebenso Kontrollen von WMT bzw. Angiotensin ohne WMS.



Hund, 14 kg, Morphin-Pernocton, Carotisdruk, i.v. Injektionen. Pro Inj. 1,5 γ Angiotensin bzw. 1,5 γ AA WMT. Ansätze: 1) 4 γ Angiotensin II; 2) 4 AA WMT;

3) 4 γ AA WMT + 1 ml WMS 1:20 säurebehandelt;

4) 4 γ AA WMT + 1 ml WMS 1:20;

5) 4 γ Angiotensin + 1 ml WMS 1:20 säurebehandelt;

6) 4 γ Angiotensin + 1 ml WMS 1:20; 7) wie 1).

1 γ AA WMT (AA: Angiotensin-Aktivität) ist die WMT-Menge, die am Blutdruck des Hundes die gleiche Wirkung hat wie 1 γ synth. Angiotensin II.

Abb. 10 Wirkung von acetongefälltem WMS; Adsorption an DEAE-Zellulose.

Hund, 8 kg, Morphin-Pernoxon, Carotisdruk; i.v. Injektionen.

1) 0,4 g Angiotensin II;

2) Ansatz: Rinderplasma + acetongereinigtes WMS nach Behandlung mit DEAE-Zellulose;

3) Ansatz: Rinderplasma + acetongereinigtes WMS;

4) Ansatz: Rinderplasma + ungereinigtes WMS;

Ansätze 2), 3), 4), inkubiert und enteiweißt wie S.6 beschrieben.

Jede Injektion entspricht 5 ml Rinderplasma

5) 0,5 ml acetongereinigtes WMS 1:20 nach Behandlung mit DEAE-Zell.

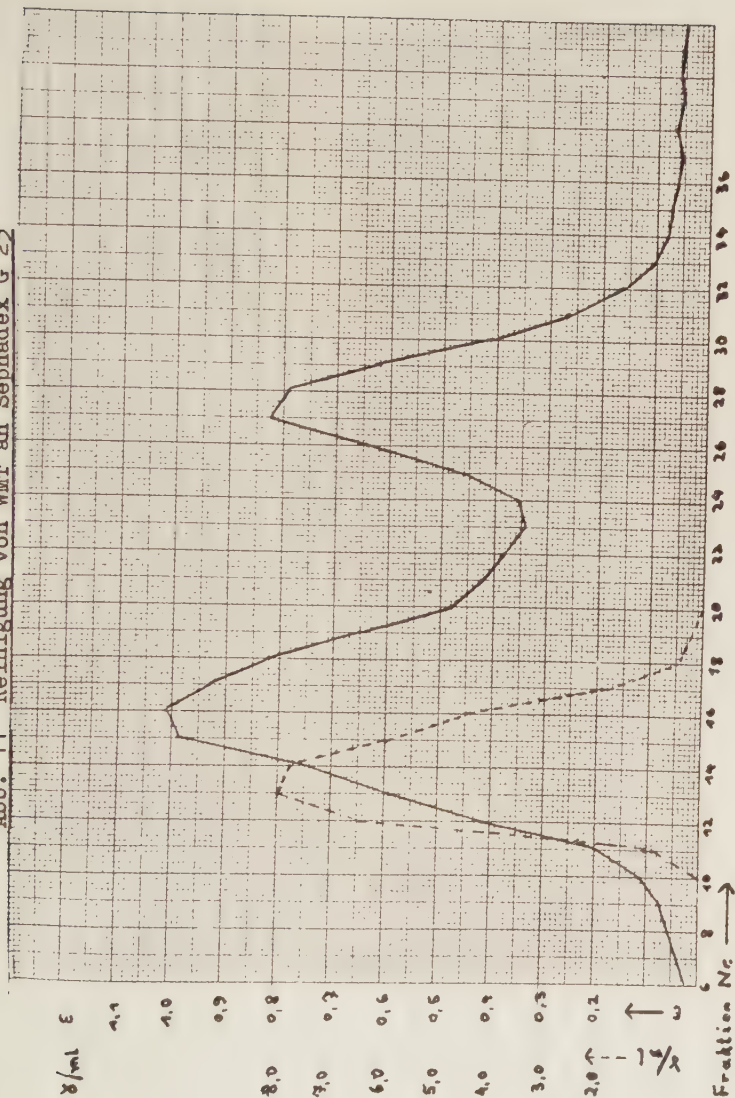
6) 0,5 ml acetongereinigtes WMS 1:20.



Abb. 9 Ansatz mit WMS nach Säurebehandlung

Jede Injektion entspricht 4 ml Rinderplasma
 Inkubation und Enteiweißung wie oben (S.)
 angegeben. 1) Kontrollansatz mit Rinder-
 plasma allein; 2) Rinderplasma + WMS, säu-
 rebehandelt (30 min. pH 3 bei 37°C);
 3) Rinderplasma + WMS.

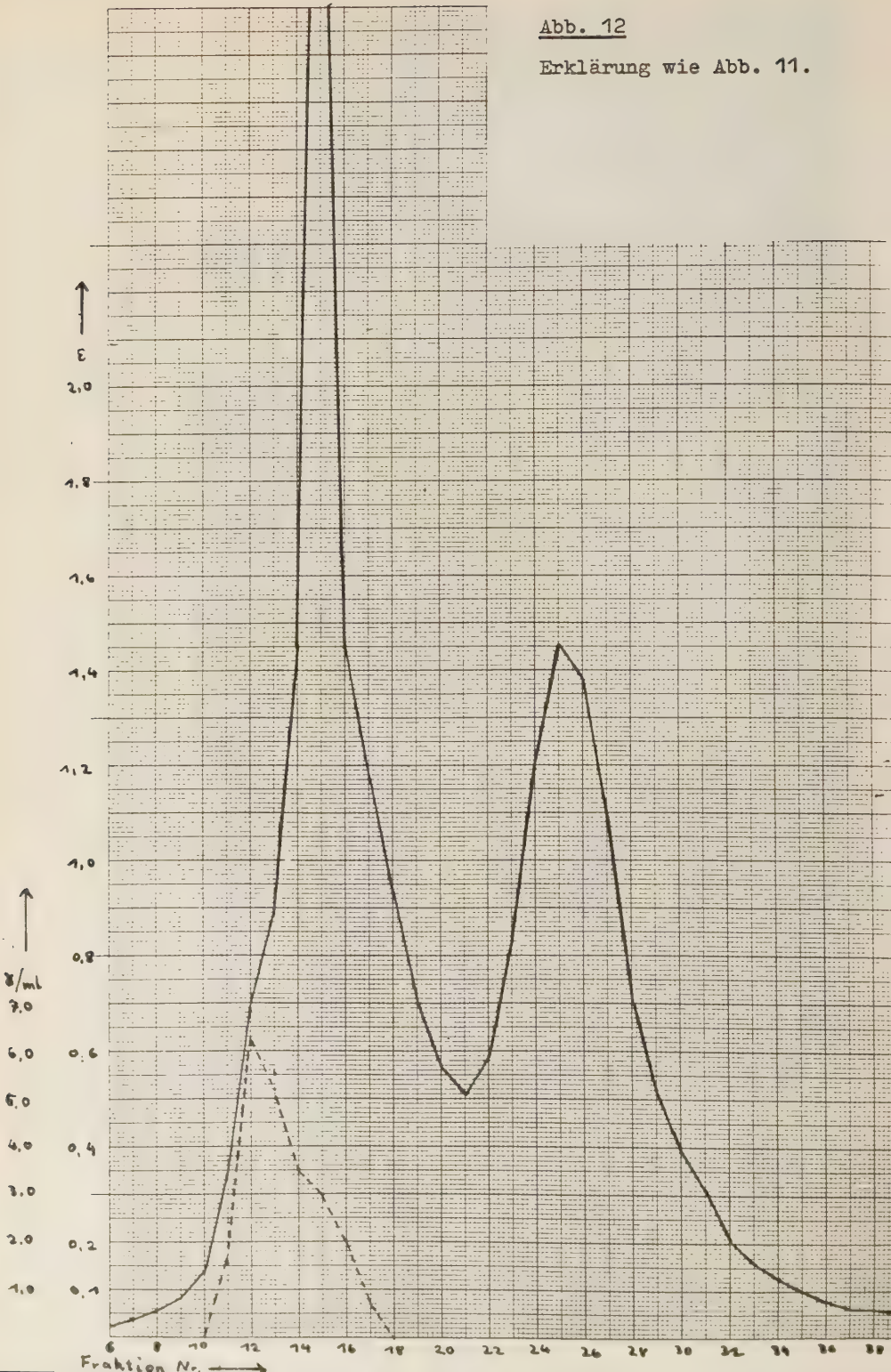
Abb. 11 Reinigung von WMT an Sephadex G 25



Ausgezogene Linie: UV-Absorption bei 280 m, gestrichelte Linie: WMT-Konzentration der ausfließenden Fraktionen. Abszisse: Fraktion Nr. ..., Ordinate: WMT-Konzentration in AA/ml bzw. Extinktion. WMT-Aktivität am Hund getestet.

Abb. 12

Erklärung wie Abb. 11.



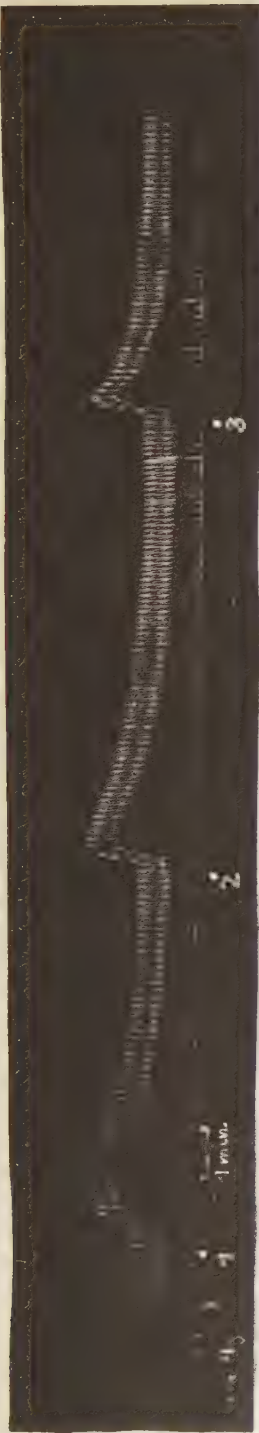


Abb. 13 Vergleich der Blutdruckwirkung von WMT, Angiotensin II und Arterenol

Hund, 12 kg, Morphin-Pernocton, Carotidsdruck.

i.v. Injektionen: 1) 1 γ AA WMT; 2) 1 γ Angiotensin II; 3) 2 γ Arterenol.

Abb. 14 (nebenstehend)
Wirkung von WMT an der isolierten
Kaninchen-Aortenspirale.

Tyrodebad, 10 ml, 37°C.

1) 0,2 γ AA WMT;

2) 10 γ Natriumazid;

3) 0,1 γ Angiotensin II;

x : Spülen.

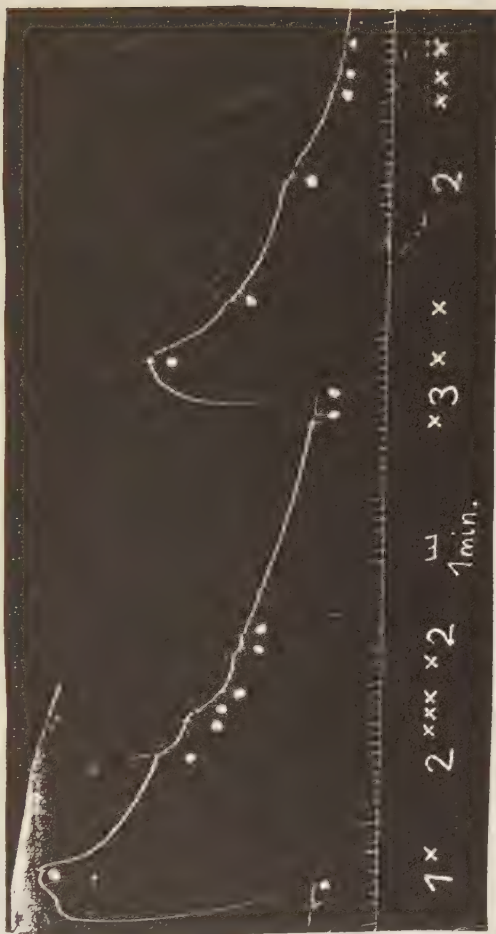


Abb. 15 Wirkung von WMT an der isolierten Kaninchen-Aortenspirale.

Tyrodebad, 10 ml, 37°C; x : Spülen.

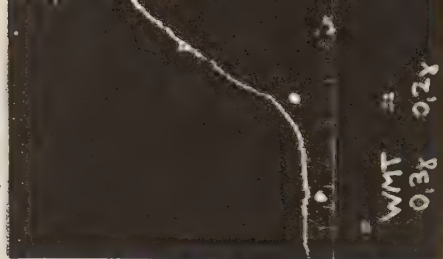


Abb. 16 Wirkung von WLT am Uterus der Ratte.



Jalon-Bad, 10ml, 31°C, Hebelübertragung 6:1

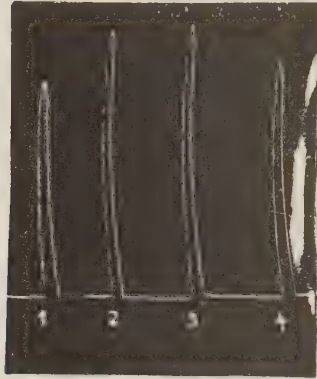
1) 0,05 γ Angiotensin II

2) 0,05 γ AA WLT

3) 0,05 γ Angiotensin II

4) 0,1 γ Angiotensin II

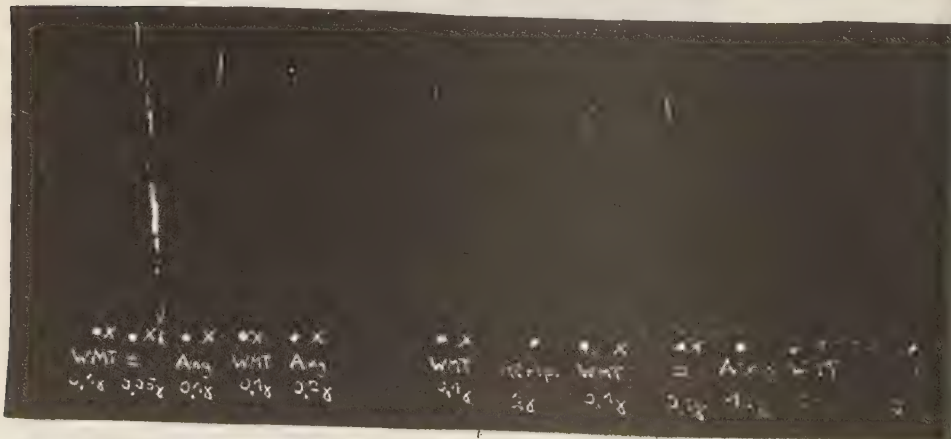
Abb. 17 Wirkung von WMT am isolierten Meerschweinchen-Darm



Tyrodebad, 10 ml, 34°C, Übertragung 7:1,

1) 0,25γ Angiotensin II; 2) 0,5γ AngiotensinII; bei 3) u. WMT-Dosen von 0,25 bzw. 0,125γ AA, d.h. die WMT-Dosen entsprachen in ihrer Blutdruckwirkung 0,25γ bzw. 0,5γ Angiotensin

Abb. 18 Wirkung von WMT am Meerschweinchendarm, Atropin-
hemmung.



Tyrodebad, 10 ml, 34°C, Übertragung 7:1; x : Spülen.

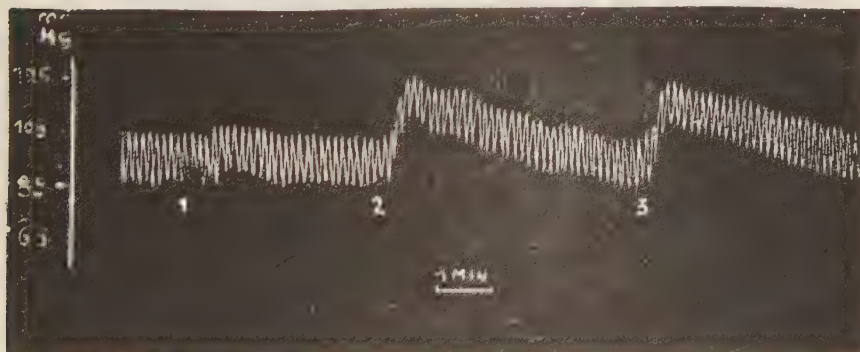
Abb. 19 Beeinflussung der WMT-Wirkung am Meerschwein-
chen-Darm durch Atropin und Prostigmin



Tyrodebad, 10 ml, 34°C, Übertragung 7:1; x: Spülen.
1) 0,1% AA WMT; 2) Atropin 2%; 3) WMT 0,2% AA; 4) Prostigmin 2%; 5) WMT 0,05% AA; 6) Angiotensin II 0,05%.

Abb. 20 Verhalten von WMT gegenüber NaOH und HCl

Je 4 ml WMT-Lösung wurden mit je 1 ml n-NaOH bzw. n-HCl versetzt. Nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde mit je 1 ml n-HCl bzw. n-NaOH neutralisiert.



Hund, 9 kg, Morphin-Pernocton, Carotisdruck.
Ansätze i.v. injiziert.
WMT 1) laugebehandelt, 2) säurebehandelt, 3) unbehandelt.

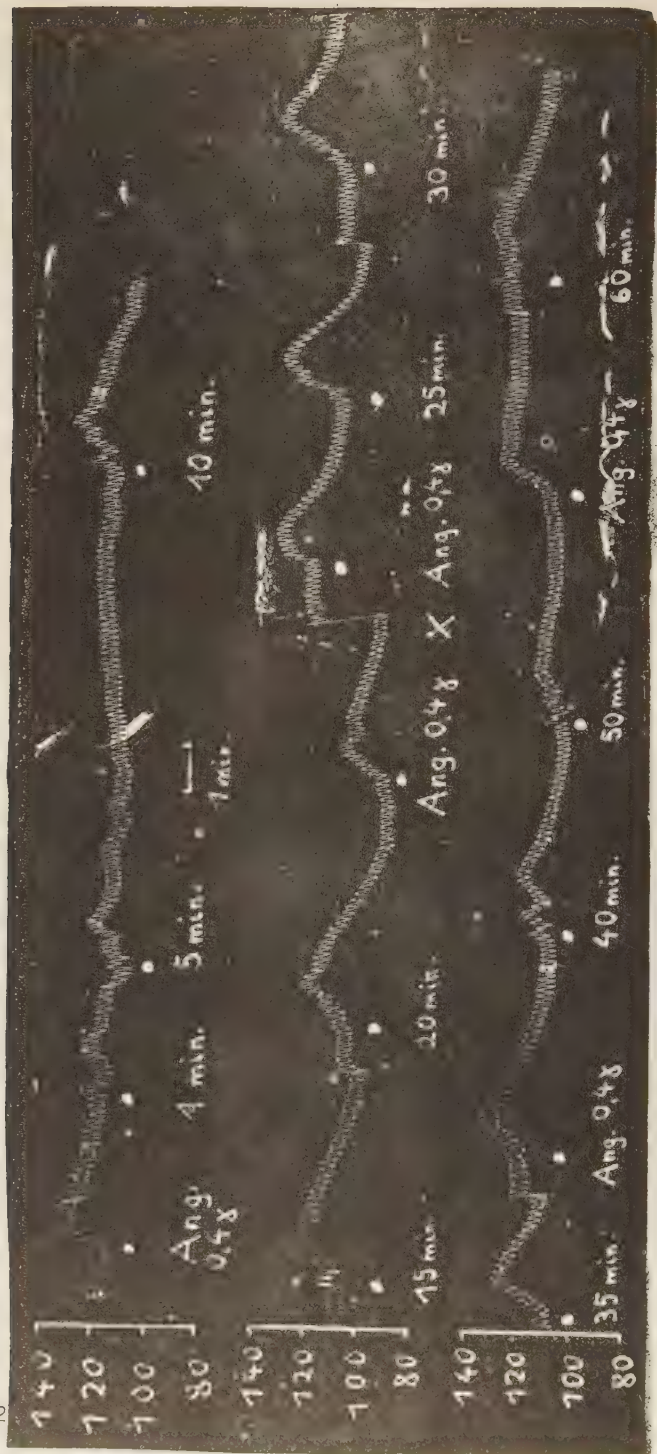


Abb. 21a Inaktivierung von WIT durch Rinderserum bei verlängerter Inkubation.
Erläuterung S. 51.

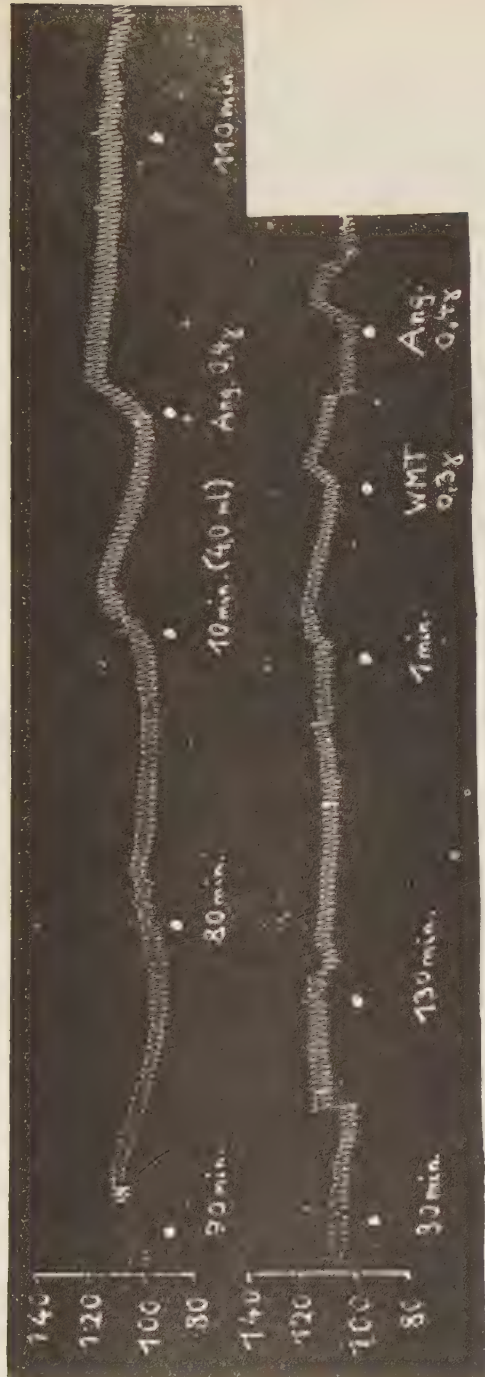
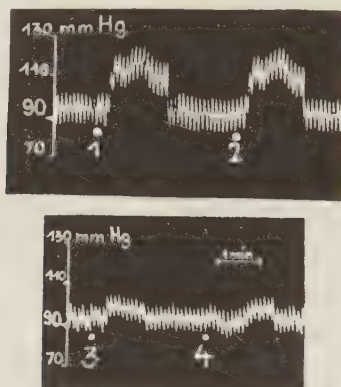


Abb. 21b Inaktivierung von WMT durch Rinderserum bei verlängerter Inkubation.
Erläuterung S. 51

Abb. 22 Inaktivierung von WMT und Angiotensin II durch
Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Gegenwart
von Methylenblau.

Äquipressorische Lösungen von WMT und Angiotensin II wurden 90 min. in 0,002 %iger Methylenblaulösung bestrahlt. Kontrollansätze blieben lichtgeschützt.



Hund, 12 kg, Morphin-Pernocton, Carotisdruck.
i.v. Injektionen: 1) u. 3) 0,75 γ Angiotensin II unbelichtet bzw. belichtet; 2) u. 4) wirkungsgleiche Mengen von WMT unbelichtet bzw. belichtet.

Zu Abb. 21 a u. b Inaktivierung von WMT durch Rinder-
serum bei verlängerter Inkubation.

Aus einem Inkubationsgemisch WMS + Rinderserum wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und sofort auf oben (S.6) beschriebene Weise verarbeitet. Je 3 ml der Proben (wenn nicht anders angegeben) wurden einem narkotisierten Hund i.v. injiziert. Die Abstände zwischen den Injektionen betrugen im allgemeinen 4 - 8 min.; einige größere Pausen wurden zur Erholung des Testhundes eingeschaltet. Zwischendurch wurde die Empfindlichkeit des Tieres mit einem Standard von synthet. Angiotensin II überprüft. Trotz tiefer Morphine-Pernocton-Narkose und maschineller Beatmung sind über größere Zeiträume hinweg langsame spontane Blutdruckschwankungen unvermeidlich, so daß bei Anhalten des Kymographions gelegentlich ein sprunghafter Kurvenverlauf resultiert.

Bei x Pause von 45 min.

Zu Abb. 23 Verhalten von WMT bei der Papierelektro-
a u. b phorese

20 AA WMT wurden auf einen Papierstreifen aufgetragen und 10 Std. bei 110 V in Phosphatpuffer pH 6 m/50 getrennt. Nach dem Trocknen wurde der Streifen längs zerschnitten, eine Hälfte mit Ninhydrin gefärbt, die andere in 7 mm breite Stücke zerschnitten, die in je 1 ml Wasser eluiert wurden. Die Eluate wurden einem narkotisierten Hund i.v. injiziert. Die Zahlenangaben unter der Blutdruckkurve bezeichnen die jeweils injizierte Menge der einzelnen Eluate. Darunter eine Skizze der angefärbten Hälfte, auf der die Lage der einzelnen Streifen angegeben ist, in die die nicht angefärbte Hälfte zerschnitten wurde.

A: Anode, K: Kathode.

Die untere Hälfte der Abb. (23 b) zeigt das Verhalten von 20 Angiotensin II, die zugleich mit dem WMT auf einem anderen Streifen getrennt und in gleicher Weise

verarbeitet wurden. Die Aktivität des WMT ist, wohl infolge der Verunreinigungen, breiter auseinandergezogen mit einem Maximum bei 11 u. 12. Bemerkenswert erscheint, daß die senkende Komponente (Kallidin) etwas schneller wandert.

Bei der Elektrophorese des reinen Angiotensin () konzentriert sich die gesamte Aktivität auf die Streifen 12 u. 13.

Zu Abb. 24 a u. b Verhalten von WMT bei der Papier-
elektrophorese

Auf zwei Streifen wurden gleichzeitig WMT bzw. WMT + Angiotensin 13 Std. lang getrennt. Die nicht angefärbten Hälften der Streifen wurden in 5 mm breite Stücke zerschnitten. Übrige Versuchsbedingungen wie zu Abb. 23 angegeben.

: WMT. Aktivität breit auseinandergezogen. Maximum bei 5 - 7. Blutdrucksenkung bei 8.

: WMT + AngiotensinII : Senkende Komponente diesmal durch das reine Angiotensin II überlagert und nicht sichtbar.

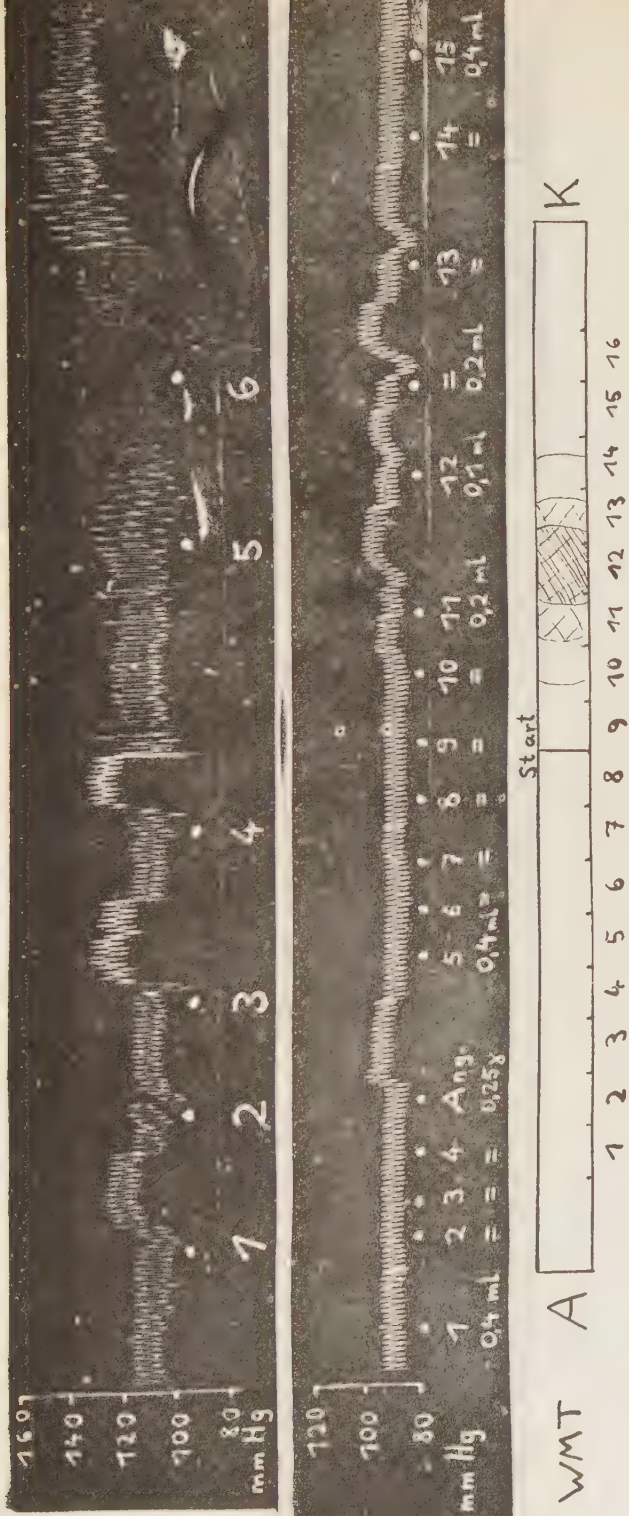


Abb. 23 Verhalten von WMT bei der Papierelektrophorese. Erläuterung S. 51.

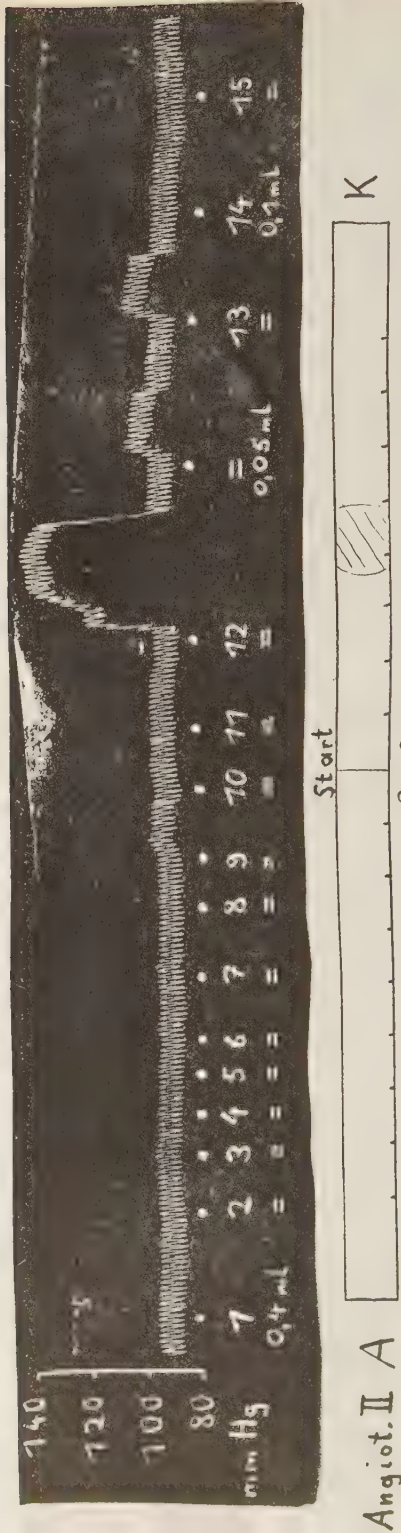


Abb. 23 Verhalten von WMT bei der Papierelektrophorese. Erläuterung S. 51.



WMT + Angiot. II A

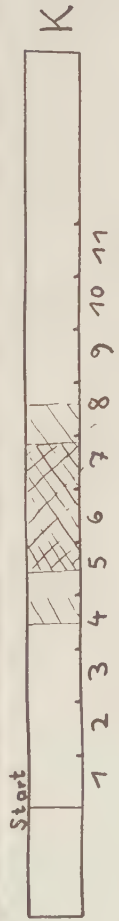
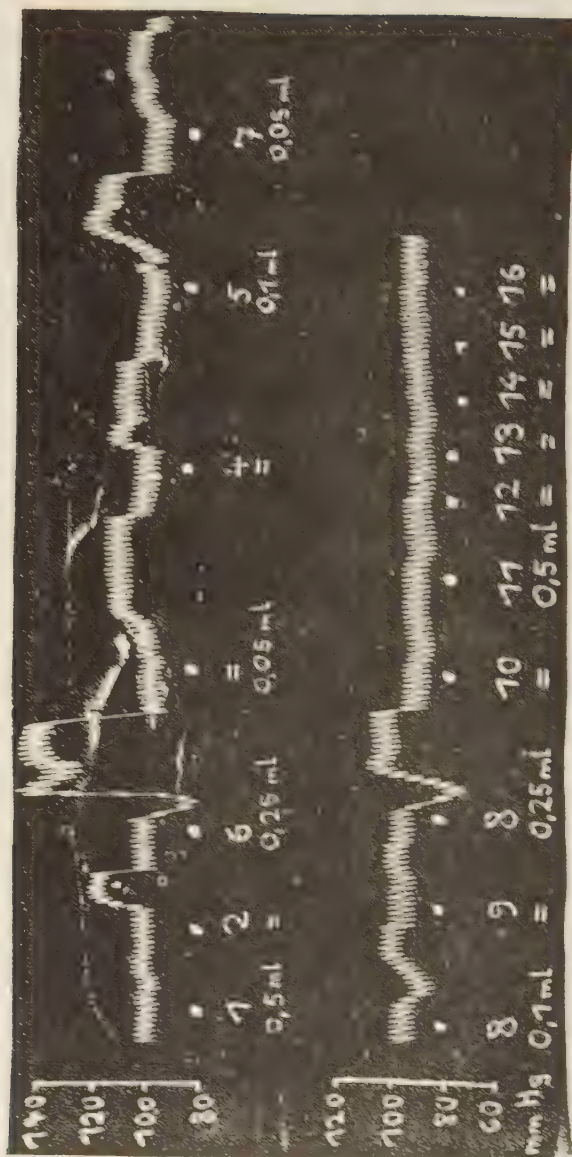


Abb. 24- Verhalten von WMT bei der Papierenktrophorese.



Start

A

K

WMT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

Abb. 24 Verhalten von WMT bei der Papierelektrophorese.

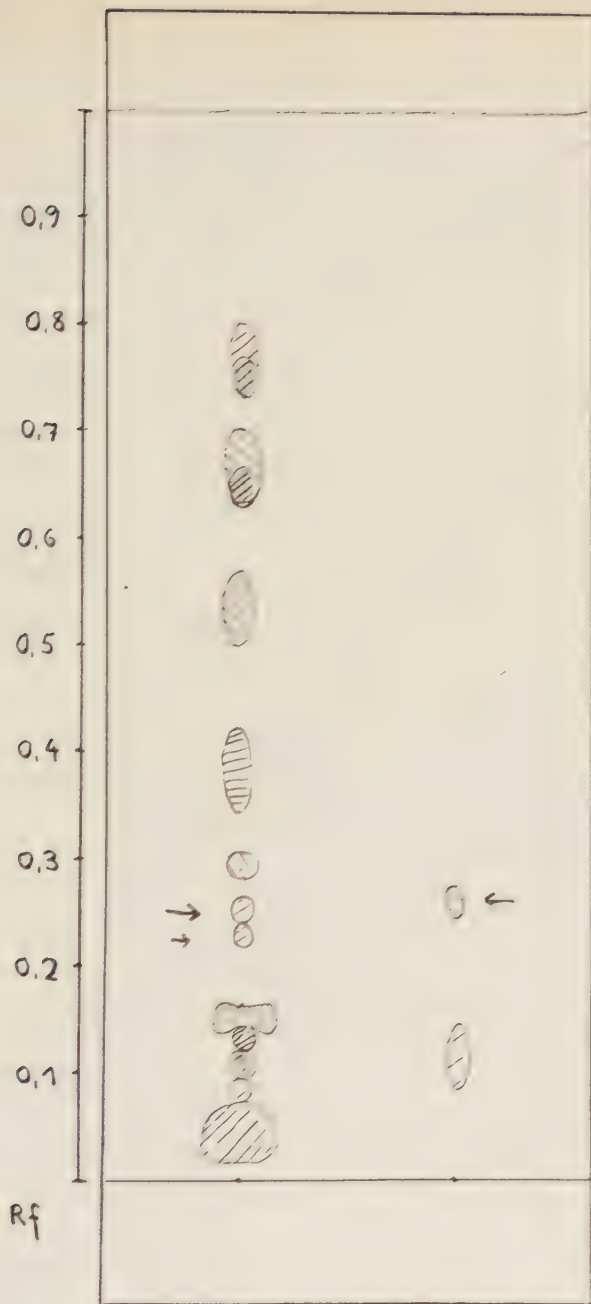


Abb. 25 Papierchromatographie von WMP und Angiotensin II.
 Entwicklung in Butanol/Ameisensäure/Wasser 6 : 1 : 1 absteigend. Die Aktivität wurde an den durch Pfeile gekennzeichneten Stellen gefunden; s. a. S.

Literaturverzeichnis

1. BUMPUS M.F., KHAIRALLAH P.A., ARAKAWA K., PAGE I.H. u. SMEBY R.R.: The relationship of structure to pressor and oxytocic actions of isoleucine angiotensin octapeptide and various analogues.
Biochim. Biophys. Acta 46, 38, (1961)
2. CARLINI E.A., PICARELLI Z.P. u. PRADO J.L.: Pharmacological activity of hypertensin I and its conversion into hypertensin II.
Bull. Soc. chim. biol. (Paris) 40, 1825-1834, (1958)
3. ELLIOTT D.F.: The chemistry of naturally occurring Angiotensins.
Polypeptides, hrsg. v. M. SCHACHTER, Oxford 1960, S. 99-105
4. FREY E.K., KRAUT H. u. WERLE E.: Kallikrein (Padutin).
Enke-Verlag, Stuttgart 1950.
5. FURCHGOTT R.F. u. BHADRAKOM S.: Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs.
J. Pharmakol. exp. Therap. 108, 129-143, (1953)
6. GROSS F.: Renin und Hypertensin, physiologische oder pathologische Wirkstoffe?
Klin. Wochschr. 36, 693, (1958)
7. GROSS F. u. LICHTLEN P.: Verstärkung der pressorischen Wirkung von Renin, drucksteigernden Peptiden und adren-
ergischen Wirkstoffen nach Nephrektomie und nach Über-
dosierung von Cortexon und Kochsalz an der Ratte.
Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 223, 323-337, (1958)
8. GROSS F. u. SULSER F.: Wirkungsverstärkung von Renin und
Nierenextrakt an der nierenlosen Ratte.
Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 223, 338-347, (1956)
9. GROSS F. u. TURRIAN H.: Pharmacology of hypertensin and
synthetic analogues.
In: Polypeptides, hrsg.v. M. SCHACHTER, Oxford 1960,
S. 137-151

10. HABERMANN E.: Zuordnung pharmakologischer Eigenschaften und enzymatischer Wirkungen von Kallikrein und Schlangengiften mittels Diisopropylfluorophosphat und Elektrophorese.
Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 240, 552-572, (1961)
11. KHAIIRALLA P.A. u. PAGE I.H.: Mechanism. of action of angiotensin and bradykinin on smooth muscle in situ.
Amer. J. Physiol. 200, 51, (1961).
12. MILITZER W., IKEDA C. u. KNEEN E.: The preparation and properties of an amylase inhibitor of wheat.
Arch. Biochem. 2, 309, (1946)
13. PAGE I.H. u. BUMPUS M.F.: Angiotensin.
Physiol. Rev. 41, 331-390, (1961)
14. PAIVA A.C.M. u. PAIVA T.B.: The photo-oxidative inactivation of angiotensinamide.
Biochim. Biophys. Acta 48, 412-414, (1961)
15. PEART W.S.: A new method of large-scale preparation of hypertensin with a note on its assay.
Biochem. J. 59, 300, (1955)
16. PEART W.S.: The isolation of a hypertensin.
Biochem. J. 62, 520, (1956)
17. PEART W.S.: Angiotensin in experimental and clinical hypertension.
In: Polypeptides, hrsg. v. M. SCHACHTER, Oxford 1960, S. 122-136
18. RAUCH S.: Die Speicheldrüsen des Menschen. Stuttgart 1959
19. SCHACHTER M.: Some properties of kallidin, bradykinin and wasp venom kinin.
In: Polypeptides, hrsg.v. M.SCHACHTER, Oxford 1960 S. 232-246
20. SCHAFFENBURG C.A., HAAS E. u. GOLDBLATT H.: Concentration of renin in kidneys and angiotensinogen in serum of various species.
Amer. J. Physiol. 199, (5), 788-792, (1960)

21. SCHWYZER R. u. TURRIAN H.: The chemistry and pharmacology of angiotensin.
Vitam. and Horm. 8, 237-288, (1960)
22. SKEGGS L.T.: Polypeptides of the renal pressor system.
In: Polypeptides, hrsg.v. M. SCHACHTER, Oxford 1960, S. 106-121
23. SUMNER J.B. u. HOWELL S.F.: A method for determination of saccharase activity.
J. Biol. Chem. 108, 51, (1935) zit. n. BERNFELD P.
in: Methods in Enzymology, New York 1935, S. 149
24. TURRIAN H.: Quelques caractéristiques du principe hypertensif contenu les glandes salivaires de la souris.
Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 18, 259, (1960)
25. WALASZEK E.J. u. HUGGINS C.G.: Substance A: a hypertensive polypeptide from fraction IV-4 of plasma protein.
J. Pharmacol. exper. Therap. 126, 258-263, (1959)
26. WEIL L. u. SEIBLES T.S.: Photooxydation of crystalline ribonuclease in the presence of methylene blue.
Arch. Biochem. Biophys. 54, 368, (1955)
27. WERLE E. u. APPEL W.: Photochemische Inaktivierung von Kallikrein durch Methylenblau.
Ztschr. f. Vitamin-,Hormon- u. Fermentforsch. VII, 24-28, (1956)
28. WERLE E., VOGEL R. u. GÖLDEL L.F.: Über ein blutdrucksteigerndes Prinzip in Extrakten aus der Glandula submaxillaris der weißen Maus.
Arch.exper. Path. Pharmacol. 230, 236, (1957)
29. WERLE E. u. VOGEL R.: Zur Kenntnis der blutdrucksteigernden Substanz aus der Glandula submaxillaris der weißen Maus.
Ztschr. f. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. 11, 245, (1960/61)
30. WERLE E. u. STÜCKER F.: Zur Pharmakologie der Azide.
Arzneim.-Forsch. 8, 28-31, (1958)

31. WERLE E. in: Polypeptides which stimulate plain muscle, hrsg. v. J.H. GADDUM, Edinburgh u. London 1955, S. 23
32. WERLE E.: Über den Wirkungsmechanismus der blutdrucksteigernden Substanz aus der Glandula submaxillaris der weißen Maus.
Naturwissenschaften 48, 104, (1961)
33. WERLE E., TRAUTSCHOLD I. u. SCHMAL A.: Über ein Iso-Enzym des Renins und über die Isolierung eines biologisch aktiven Spaltproduktes seines Substrates.
Hoppe-Seylers Ztschr. f. physiol. Chem. 332, 79-81, (1963)

LEBENS LAUF

Am 4. August 1934 wurde ich in Arnsberg/Westf. als erstes von sieben Kindern des Facharztes für Innere Medizin Dr. med. Reinhold Baumeister und seiner Ehefrau Hildegard geb. Schulze geboren. Ich besuchte seit 1941 die Volksschule und seit 1946 das Staatl. Humanistische Gymnasium Laurentianum in Arnsberg, wo ich 1954 die Reifeprüfung ablegte. Den vorklinischen Teil des Medizinstudiums absolvierte ich in Münster und Freiburg, wo ich 1956 die ärztliche Vorprüfung mit "sehr gut" bestand, den klinischen Teil in Freiburg und München. Dort bestand ich 1960 das medizinische Staatsexamen mit "sehr gut". Nach der Medizinalassistentenzeit in München und Arnsberg erhielt ich 1962 die Approbation als Arzt. Seit Oktober 1962 arbeite ich an der Neurologischen Universitätsklinik in Hamburg-Eppendorf.

